

Sepsis:
Erkennung bakterieller RNA
durch murine und humane
Mustererkennungsrezeptoren

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
Dr. rer. nat.

Der Fakultät für Biologie an der
Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von
Marina Oldenburg

aus Kamen
Juni 2015

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden am Institut für Medizinische Mikrobiologie der Universität Duisburg-Essen durchgeführt.

Gutachter: Prof. Dr. C. J. Kirschning

Gutachter: Prof. Dr. S. Brandau

Gutachter: Prof. Dr. K. Pfeffer

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. M. Ehrmann

Tag der mündlichen Prüfung: 28.10.2015

1	Einleitung	8
1.1	Immunsystem	8
1.2	Mustererkennungsrezeptoren	10
1.2.1	C-Typ-Lektine	11
1.2.2	Scavenger Rezeptoren	11
1.2.3	NOD-ähnliche Rezeptoren und Inflammasome	11
1.2.3.1	Inflammasom	12
1.2.4	RIG-ähnliche Helikasen	13
1.2.5	Toll-ähnliche Rezeptoren	14
1.2.6	Struktur	15
1.2.7	Akzessorische Proteine und Signalwege	16
1.2.8	Erkennung spezifischer Ligandenmuster	19
1.2.9	Waise (<i>orphan</i>) murine TLR	23
1.3	RIG-I-ähnliche Rezeptoren (RLRs)	24
1.3.1	Struktur	24
1.3.2	LGP2	25
1.3.3	MDA5	26
1.3.4	RIG-I	26
1.3.5	RIG-I induzierter Signalweg	27
1.4	Zielsetzung	28
2	Material & Methoden	29
2.1	Material	29
2.1.1	Geräte, Verbrauchsmaterial und Zubehör	29
2.1.2	Chemikalien und Lösungsmittel	30
2.1.3	Kitsysteme	35
2.1.4	Größenstandards und Enzyme	35
2.1.5	Puffer und Lösungen	36
2.1.5.1	Puffer für die Gelelektrophorese	38
2.1.5.2	Western Blot	38
2.1.5.3	ELISA	39

2.1.5.4	Luciferase-Assay	39
2.1.5.5	Lysepuffer für Mausgewebe	40
2.1.5.6	Zellkulturzusätze	40
2.1.6	ELISA Kits	41
2.1.7	Antikörper und Konjugate für den Western Blot	41
2.1.8	Oligonukleotide und Liganden	42
2.1.9	Vektoren	44
2.1.10	Zellkultur	46
2.1.10.1	Zelllinien	46
2.1.10.2	Zellkulturmedien	47
2.1.11	Bakterien – Medien und Stämme	49
2.1.12	Medien	49
2.1.13	Mäuse	51
2.1.14	Liganden	51
2.1.15	Verwendete Software	52
2.2	Zellbiologische Methoden	52
2.2.1	Kultivierung von <i>human embryonic kidney</i> 293 Zellen (HEK293)	53
2.2.2	Kultivierung von RAW264.7 Makrophagen	53
2.2.3	Kultivierung und Ausdifferenzierung von THP-1 Zellen	53
2.2.4	Isolierung humaner mononukleärer Zellen (hPBMC)	53
2.2.5	Gewinnung von murinen primären Knochenmarks-makrophagen (BMDM)	54
2.2.5.1	Konventionelle Differenzierung zu Makrophagen auf Zellkulturplatten	54
2.2.5.2	Differenzierung der Knochenmarkszellen im Teflonbeutel	55
2.2.6	Elektroporation von primären Makrophagen mit siRNA	55
2.2.7	Bestimmung der Stickstoffmonoxid Konzentration	56
2.2.8	<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i> - ELISA	57
2.2.9	Luciferase Reporter Assay	57
2.2.10	Hitzeinaktivierung von Bakterien	59
2.3	Molekularbiologische Methoden	60
2.3.1	DNA Isolation aus Mausgewebe	60
2.3.2	Transformation von Bakterien	60
2.3.3	Präparation von Plasmid DNA aus Bakterien	60

2.3.4	TA-Klonierung	61
2.3.5	PCR-Aufreinigung	62
2.3.6	Gelextraktion	62
2.3.7	DNA-Sequenzierung	62
2.3.8	Polymerase Kettenreaktion (PCR)	63
2.3.8.1	Genotypisierung	63
2.3.8.2	<i>Site-directed Mutagenesis</i>	63
2.3.9	<i>Real-time</i> PCR	65
2.3.10	RNA-Isolation	66
2.3.11	Reverse Transkription in cDNA	67
2.3.12	Hydrolyse bakterieller RNA	68
2.4	Proteinbiochemische Methoden	68
2.5	Gewinnung von Zelllysaten	68
2.6	Analyse der Proteinkonzentration	68
2.7	Eindimensionale Proteinauftrennung	69
2.8	Western Blot Analyse	70
2.9	Statistische Auswertung	70
3	Ergebnisse	71
3.1	Charakterisierung der Funktion endosomaler TLRs in der Erkennung von Gram-positiver Bakterien	71
3.1.1	Rolle der TLR -11, -12 und -13 in der Erkennung von bakterieller RNA	73
3.1.2	Identifizierung eines spezifischen 23S rRNA Segments als TLR13-aktivierendes Motiv	75
3.1.2.1	Identifizierung der 23S rRNA als stimulierende Fraktion	75
3.1.2.2	Rolle der MLS Resistenz vermittelnden Methylierung in der Erkennung der 23S rRNA durch TLR13	78
3.1.3	Untersuchung der 23S rRNA Maskierung durch Methyltransferasen	80
3.1.3.1	Untersuchung von klinischen MRSA-Isolate auf ihr TLR13 aktivierendes Potential	80
3.1.3.2	Überexpression von ermB und ermC in Gram-negativen und Gram-positiven Bakterien maskiert deren RNA vor TLR13	82

3.1.4	TLR13 ist der Rezeptor des 23S rRNA Segments „Sa19“	84
3.1.5	Spezifizierung der stimulativen Sequenz der 23S rRNA	89
3.2	Suche nach dem humanen Rezeptor von Sa19 als Surrogat immunstimulativer bakterieller RNA	93
3.2.1	Etablierung einer auf Sa19 reagierenden Zelllinie	94
3.2.2	Rolle von endosomalen TLRs in der Erkennung von aus der mitochondriellen 16S und der bakteriellen 23S rRNA ausgewählten Segmenten	100
3.2.3	hTLR8 erkennt mitochondrielle und bakterielle ribosomale RNA	105
3.2.4	Rolle von TLR8 und TLR2/4 bei bakteriellen Infektionen	110
3.3	Die Rolle von RIG-I in der Erkennung bakterieller RNA	114
3.3.1	Gram-negativ bakterielle RNA wird über RIG-I erkannt	115
3.3.2	Identifizierung der RIG-I aktivierenden RNA Subspezies	118
3.3.3	Charakterisierung der tRNA als stimulatives Motiv	120
3.3.4	Abhängigkeit von IPS-1 in der RIG-I Signalkaskade	122
4	Diskussion	125
4.1	Funktion der endosomalen TLR in der Erkennung Gram-positiver Bakterien	125
4.1.1	Bakterielle RNA wird nicht über TLR11 oder 12 erkannt	126
4.1.2	Endosomaler TLR13 erkennt eine spezifische Sequenz der 23S rRNA	126
4.1.3	Methyltransferasen maskieren die 23S rRNA vor dem Immun-system und vermitteln MLS-Resistenzen	127
4.1.4	TLR13 erkennt eine 12 Nukleotide beinhaltende Sequenz der 23S rRNA	129
4.2	TLR8 als TLR13 Äquivalent im Menschen	131
4.2.1	Rolle der humanen endosomalen TLR in der Erkennung von bakterieller und mitochondrieller RNA	132
4.2.2	Relevanz von TLR8 in der durch Gram-positiv und Gram-negativ bakteriellen Infektion vermittelten Sepsis	136
4.3	RIG-I als Sensor für Gram-negativ bakterielle RNA	137
5	Zusammenfassung	140
6	Summary	142

7	Literaturverzeichnis	144
8	Abkürzungsverzeichnis	162
9	Tabellenverzeichnis	168
10	Abbildungsverzeichnis	169
11	Danksagung	172
12	Lebenslauf	173
13	Erklärung	174

1 Einleitung

1.1 Immunsystem

Die Evolution zu mehrzelligen Organismen führte durch Selektion zur Entwicklung von Abwehrsystemen, die bereits bei einfachsten Organismen zu finden sind. Kieferlose Wirbeltiere wie Rundmäuler entwickelten zusätzlich zu der unspezifischen Abwehr ein zunächst rudimentäres adaptives System, das sich während der Evolution weiter spezialisierte (Litman et al. 2010, Kasamatsu 2013). Eine erste Hürde gegen das Eindringen in den Organismus von Pathogenen wie Bakterien, Viren, Pilze, Parasiten und Giften stellen die äußeren Schutzbarrieren wie Haut, Schleimhäute und Flüssigkeiten wie Tränenflüssigkeit, Speichel und Magensaft dar. Kommt es dennoch zu einer Infiltration, wird die angeborene/unspezifische Immunantwort und damit lokale Abwehrzellen wie Makrophagen, dendritische Zellen (DCs), Mast-Zellen, neutrophile Granulozyten, eosinophile und basophile Granulozyten sowie das Komplementsystem aktiviert. Die Antigenpräsentation auf der Oberfläche dieser Abwehrzellen und Sezernierung löslicher Antikörper sowie Botenstoffe wie Zytokine und Chemokine werden durch das adaptive Immunsystem aktiviert.

Die evolutionär jüngere adaptive Immunantwort richtet sich spezifisch gegen Komponenten (Antigene) von Pathogenen. Das adaptive Immunsystem bilden T- und B-Lymphozyten, die nach ihrem Bildungsort (T = Thymus, B = Bursa Fabricii, einem lymphoiden Organ bei Vögeln) benannt wurden und durch die Bildung klonaler Antigenrezeptoren charakterisiert sind.

Die Aktivierung von T-Zellen führt zu einer Prägung von zytotoxischen (cT) und regulatorischen T-Zellen (Treg), T-Helfer- oder natürlichen Killer T-Zellen (NKT-Zellen). Die B-Lymphozyten entwickeln sich zu Plasmazellen, die spezifische Antikörper sezernieren oder zu Gedächtniszellen, welche die Antigeninformation speichern. Bei der Abwehr invasiver, pathogener Mikroorganismen kann eine systemische Überreaktion der körpereigenen Immunantwort auftreten (Sepsis), die Gewebe und Organe schädigt und letztlich zum Tod führen kann (Abbildung 1). Derzeit erkranken jährlich weltweit 20 bis 30 Millionen Menschen an **Sepsis**, weshalb es alle drei bis vier Sekunden zu einem Todesfall kommt (Welt Sepsis Deklaration, 2013). Einer Studie von 2011 zufolge ist die Sepsis neben Osteoarthritis und Transplantation auf Platz eins der kostspieligsten Erkrankungen in Krankenhäusern und

hat im Jahr 2011 in Amerika ca. 20,3 Milliarden Dollar Kosten verursacht (Torio und Andrews 2006). Laut WHO ist die frühe Behandlung einer Sepsis kostendeckend, oft wird sie aber übersehen oder zu spät erkannt. Die Diagnose dieses Krankheitsbildes erfolgt über vier klinische Kriterien. Dabei wird eine veränderte Körpertemperatur (<36 oder $>38^{\circ}\text{C}$), eine erhöhte Herzfrequenz ($>90/\text{min}$) sowie eine gesteigerte Atemfrequenz (Tachypnoe $>20/\text{min}$) und eine ebenfalls veränderte Leukozytenanzahl ($<4000/\text{mm}^3$ oder $>12000/\text{mm}^3$) einhergehend mit einer Infektion pathogener Substanzen beobachtet (Bone et al. 1992). Die Hauptursachen einer Sepsis sind Infektionen mit Gram-negativen oder Gram-positiven Bakterien und zu einem geringeren Anteil auch Viren, Parasiten oder Pilzen (Abbildung 1).

Die sterile systemische Inflammation (*systemic inflammatory response syndrome*, SIRS) weist die gleichen klinischen Kriterien auf, die jedoch in Abwesenheit einer Invasion pathogener Erreger entstehen. In den letzten Jahren nahm die Zahl der durch Gram-positiven Bakterien ausgelösten Sepsis-Erkrankungen bzw. ihrer Diagnose drastisch zu (Martin et al. 2003). Die Behandlung der bakteriell induzierten Sepsis durch Antibiotika wird durch Resistenzen, die durch chromosomale Mutationen oder Gentransfers entstehen, zunehmend erschwert (Giedraitiene et al. 2011).

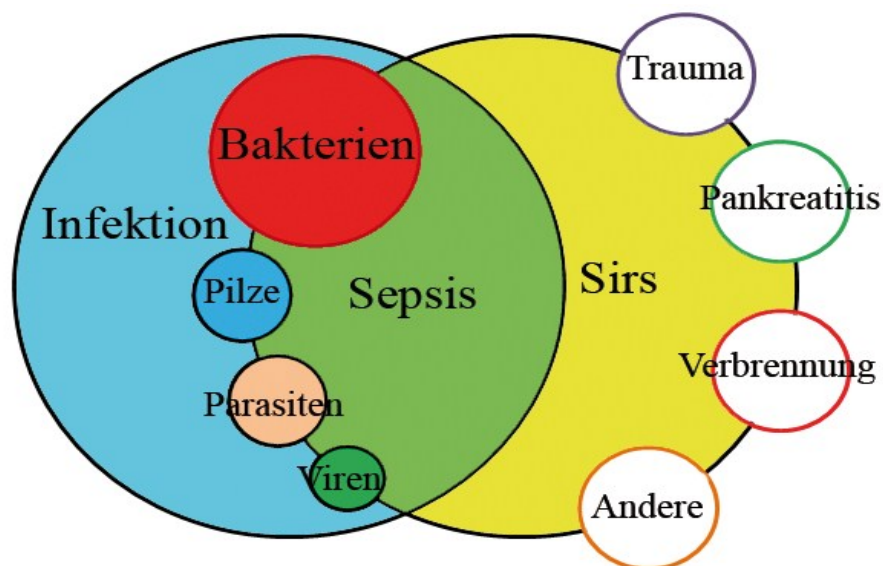


Abbildung 1: Sepsis und SIRS induzierende Ereignisse. Sepsis wird durch Bakterien, Pilze, Parasiten und Viren induziert, wohingegen Traumata, Pankreatitis und Verbrennungen Hauptverursacher von SIRS (sterile systemische Inflammation) sind. Venn Diagramm verändert nach Bone et al. (1992).

Konservierte mikrobielle Bestandteile, sogenannte Pathogen-assoziierte molekulare Muster (*pathogen associated molecular patterns*, PAMPs) wie Zellwandproteine, Flagellin und Nukleinsäuren werden nach Invasion des Wirtes spezifisch durch Mustererkennungsrezeptoren (*pattern recognition receptors*; PRRs) von Zellen der angeborenen Immunantwort erkannt. (Janeway 1989, Medzhitov und Janeway 1997)

1.2 Mustererkennungsrezeptoren

Im Gegensatz zu den klonal verteilten Rezeptoren der adaptiven Immunantwort weisen Zellen des angeborenen Immunsystems ein für den Zelltyp spezifisches Kontingent an Mustererkennungsrezeptoren auf. Zu ihren Aufgaben gehört das Einleiten der Phagozytose von Pathogenen, die Ausschüttung von chemotaktischen Botenstoffen, um Zellen der adaptiven Immunantwort zum Infektionsherd zu locken sowie die Produktion von Proteinen und Zytokinen, die sowohl pro- als auch anti-inflammatorischen Einfluss nehmen können. Neben diesen membranständigen und zytoplasmatischen Rezeptoren gibt es zusätzlich die Gruppe der löslichen PRRs. Zu ihnen gehört das mannosebindende Lektin (MBL), das frei im Blutplasma zirkuliert und spezifisch bakterielle, fungale und virale Zuckerreste erkennt (Gadjeva et al. 2004). Auch die Surfactant-Proteine A und D, die von der Lunge in die Flüssigkeit des alveolären Epithels sezerniert werden und dort ein breites Spektrum an PAMPs von Bakterien und Pilzen binden, gehören zu dieser Gruppe (Wright 2005). Die Bindung der pathogenen Stoffe an den jeweiligen Rezeptor führt schließlich zur Opsonierung und damit zur Aufnahme durch Phagozyten und im Fall des MBL zur Komplementaktivierung (Gal und Ambrus 2001). Zur Gruppe der **membranständigen** PRR zählen die Komplement-Rezeptoren, die C-Typ-Lektin-Rezeptoren (CLRs), Scavenger-Rezeptoren und einige Toll-ähnliche Rezeptoren (*toll-like receptors*, TLR) (Hawlich und Kohl 2006, Greaves und Gordon 2009, Takeuchi und Akira 2010, Hoving et al. 2014). Das **Komplementsystem** ist evolutiv gesehen eines der ersten Systeme der angeborenen Immunität und besteht aus im Blutplasma gelösten oder zellgebundenen Proteinen. Die Rezeptoren vermitteln die Phagozytose von Erregern und aktivieren daraufhin chemotaktisch mobile Zellen (Montz et al. 1991, Underhill und Ozinsky 2002, Jiang et al. 2014).

1.2.1 C-Typ-Lektine

Mitglieder der **C-Typ-Lektine** zeichnen sich durch eine CTL-Domäne (*C-type lectin-like domain*) aus und werden von dendritischen und myeloiden Zellen exprimiert (Taylor et al. 2007) (Abbildung 2). Sie binden Kalzium-abhängig oder -unabhängig Kohlenhydratstrukturen, die vor allem in der Zellwand von Pilzen, Viren, Helminthen und Bakterien zu finden sind (Weis und Drickamer 1996, Zelensky und Gready 2005). Dectin-2 z. B. erkennt Bestandteile von Pilzen wie *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae* (McGreal et al. 2006, Sato et al. 2006) und von Plathelminthen wie *Schistosoma mansoni* (Ritter et al. 2010). Mincle ein weiteres Mitglied dieser Gruppe und wird durch Mycobakterien oder Pilze der Gattung *Malassezia* aktiviert (Ishikawa et al. 2009, Yamasaki et al. 2009).

1.2.2 Scavenger Rezeptoren

Die **Scavenger Rezeptoren** sind hauptsächlich für die Aufnahme und Beseitigung von körpereigenen Abfallprodukten wie Moleküle und apoptotische Zellen zuständig. Sie weisen untereinander sequenzielle und strukturelle Unterschiede auf und werden aufgrund der 14 charakteristischen Protein-Domänen in acht Klassen unterteilt (Canton et al. 2013). Ursprünglich wurden sie als Rezeptoren von Lipoproteinen mit geringer Dichte beschrieben und seit 2006 auch als Sensoren mikrobieller Proteine, Polysaccharide und Lipoteichonsäure (van der Laan et al. 1999, Pluddemann et al. 2007, Pluddemann et al. 2011, Canton et al. 2013).

1.2.3 NOD-ähnliche Rezeptoren und Inflammasome

Mitglieder der NOD ähnlichen Rezeptoren (*NOD-like receptors, nucleotide-binding domain leucine-rich repeat containing receptor, NLR*) gehören zu den im Zytoplasma lokalisierten Rezeptoren (Abbildung 2). Die Familie der **NLR** ist mit 22 Mitgliedern in der Maus und 34 Mitgliedern im humanen System vertreten, die sich in fünf Subfamilien untergliedern lassen (Ting et al. 2008, Lamkanfi und Dixit 2012). Charakteristisch für die NLR ist die Aufteilung in drei Domänen, die zentral lokalisierte Nukleotid-Binde-Domäne (NACHT), eine C-terminale Leucin-reiche Domäne (*leucine-rich repeat, LRR*) und eine variable N-terminale Protein-Protein Interaktionsdomäne (Dunkle et al. 2010).

Unterschiede in der N-terminalen Domäne führen zur Unterteilung in die NOD und Inflammasomen-bildenden NLR. Erstere besteht aus einer zentralen NACHT Domäne, an die sich N-Terminal eine Caspase Rekrutierungsdomäne (*caspase recruitment domain*, CARD), eine Pyrin Domäne (PYD) oder *Baculovirus inhibitor repeats* (BIRs) angliedert (Polacek et al. 2001). NOD1 und NOD2 waren die ersten beschriebenen NLRs, die intrazelluläre mikrobielle Peptide erkennen und über RIP2 (*receptor-interacting protein 2*) die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren zur Produktion von proinflammatorischen Mediatoren induzieren (Kariko et al. 2005).

1.2.3.1 Inflammasom

Die Inflammasom-bildenden NLR und AIM2-ähnlichen Rezeptoren bilden heterogene Multiproteinkomplexe und aktivieren die proinflammatorische Caspase 1 (Martinon et al. 2002). Sie lassen sich in ASC (*apoptosis associated speck-like protein containing a CARD*) rekrutierende, z. B. NLRP3 und AIM2 (*absent in melanoma 2*) und ASC unabhängige Inflammasome z. B. NLRC4 und NLRP1 gliedern. Durch Aktivierung der Sensorproteine rekrutiert ASC über seine CARD-Domäne Pro-Caspase-1, welche sich durch autokatalytische Spaltung aktiviert und zytosolisch vorliegende Pro-Formen der Zytokine IL-1 β , IL-18 und IL-33 prozessiert (Raetz et al. 2013). ASC-unabhängige Inflammasome interagieren direkt über CARD-CARD Bindung mit Pro-Caspase-1 (Van Opdenbosch et al. 2014).

Für die Inflammasome wurden virale dsRNA, virale Imidazoquinoline, bakterielle RNA und Toxine wie Nigericin oder Listeriolysin O als Liganden beschrieben (Gurcel et al. 2006, Kanneganti et al. 2006, Allen et al. 2009, Sha et al. 2014). Das Krankheitsbild der Gicht wird durch Entzündungsreaktionen in den Gelenken, durch Ureat- und Kalzium-Pyrophosphat-Dihydrat Kristalle, die das NLRP3-Inflammasom aktivieren, induziert (Martinon et al. 2006). AIM2 wurde 2009 als Sensor für zytosolische dsDNA beschrieben (Hornung et al. 2009). Demnach erkennt AIM2 neben der bakteriellen auch virale DNA von Vacciniaviren (Pockenviren) (Fernandes-Alnemri et al. 2010, Wilkins und Gale 2010). Es enthält eine N-terminale Pyrin und eine C-terminale HIN200 Domäne. Letzere bindet dsDNA und rekrutiert über ASC die Caspase-1 (Fernandes-Alnemri et al. 2009).

1.2.4 RIG-ähnliche Helikasen

Neben den bereits oben genannten zytoplasmatischen Rezeptorgruppen stellen die sogenannten RIG-ähnlichen Helikasen (*RIG-like helicase*, RLHs) eine weitere wichtige Rezeptorgruppe dar (Abbildung 2). Sie besteht aus drei Mitgliedern, den namensgebenden *retinoic acid-inducible gene 1* (RIG-I), dem *melanoma differentiation-associated protein 5* (MDA5) und dem *laboratory of genetics and physiology 2* (LGP2). Während RIG-I und MDA5 aus zwei N-terminalen Caspase Rekrutierungsdomänen (CARDs), einer zentralen DECH-box RNA Helikase und einer C-terminalen regulierenden Domäne (CTD) besteht, fehlen die beiden CARDs bei LGP2. Nach Aktivierung durch einzelsträngige (ss) und doppelsträngige (ds) viraler RNA werden Typ-I Interferone (IFN) und weitere proinflammatorische Zytokine über das Adapterprotein MAVS (*mitochondrial antiviral-signaling protein* auch bekannt unter IPS-1, CARDIF oder VISA) und die Transkriptionsfaktoren IRF3 und 7 (*interferon regulatory factor*) induziert (Kawai et al. 2005, Takeuchi und Akira 2008, Freaney et al. 2013, Liu et al. 2013). Diese Gruppe wird im weiteren Verlauf detaillierter beschrieben.

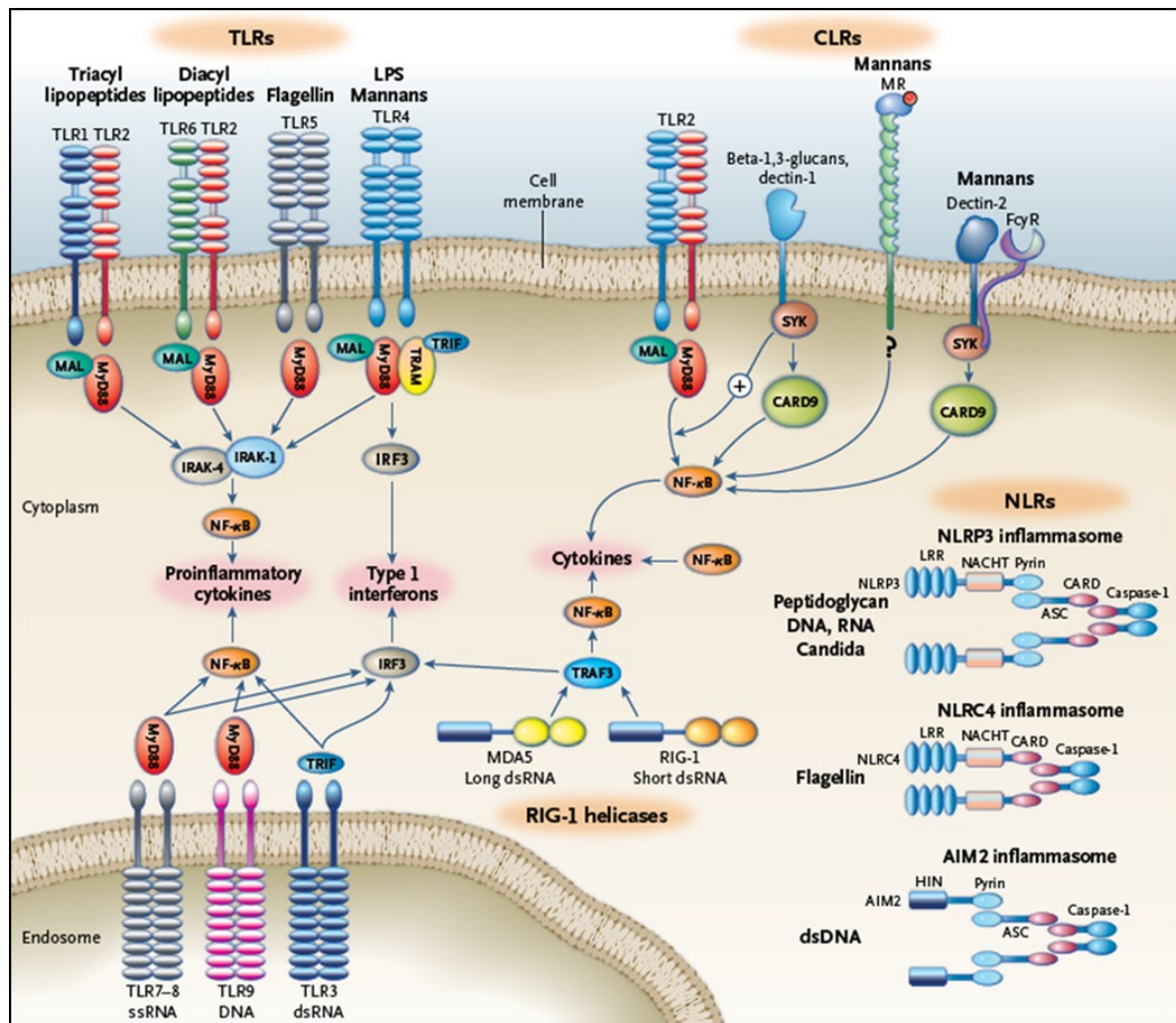


Abbildung 2: Mustererkennungsrezeptoren. Die Mitglieder der TLR Familie kommen membrangebunden oder endosomal vor, wohingegen die Mitglieder der C-Typ-Lektine (CLR) in der Zytoplasmamembran verankert sind. Bei den Familienmitgliedern der RIG-I Helikasen (RLH) und NOD-like Rezeptoren (NLR) handelt es sich um zytoplasmatische Rezeptoren (Netea und van der Meer 2011). Die PRRs induzieren nach Aktivierung proinflammatorische Zytokine, Chemokine und Typ-I Interferone.

1.2.5 Toll-ähnliche Rezeptoren

Der Rezeptor "TOLL" wurde 1985 aus der Taufliege *Drosophila melanogaster* von der Gruppe um die Entwicklungsbiologin Prof. Dr. Christine Nüsslein-Volhard beschrieben. Zusammen mit zwei Kollegen erhielt sie 1995 den Nobelpreis für grundlegende Erkenntnisse zur genetischen Kontrolle der Embryonalentwicklung, in die TOLL involviert ist.

Erst 1996 entdeckten Wissenschaftler um Lemaitre TOLLs Rolle in der Immunabwehr in der Fruchtfliege (Lemaitre et al. 1996, Mitcham et al. 1996) und 1997 wurden diese „tollen“ Proteine erstmals als „*orphanreceptor*“ mRNAs und Gene im Menschen identifiziert (Mitcham et al. 1996, Rock et al. 1998). Seither sind 10 Rezeptoren im humanen (TLR1-10) und 13 (TLR1-9, 11, 12 und 13) im murinen System beschrieben worden. 2011 erhielten Prof. Dr. Bruce Beutler und Prof. Dr. Jules Hoffmann den Nobelpreis für ihre Arbeiten über Toll/Toll-like Rezeptoren, was die Relevanz dieser Rezeptorgruppe in der Immunantwort verdeutlicht. Neben der Sepsispathologie werden diesen Rezeptoren eine Rolle von Autoimmunerkrankungen wie der Arthritis, Asthma, Diabetes mellitus Typ I und Lupus erythematodes (SLE) zugeschrieben (Rahman und Eisenberg 2006, Huang und Pope 2009, Zipris 2010, Bezemer et al. 2012).

1.2.6 Struktur

TLR werden in allen Vertebraten exprimiert, ein Indiz für ihr evolutionär hohes Alter. Sie werden von Immunzellen wie den Monozyten, Makrophagen, Granulozyten, natürlichen Killerzellen, Mastzellen oder dendritischen Zellen exprimiert sowie in gewebe-spezifischen Zellen wie intestinalen Epithel-, Leber-, und Nierenzellen und sogar Neuronen. Bezeichnend für alle TLR ist ihre Struktur. Es handelt sich um Typ-I Transmembran-Proteine, bestehend aus drei Strukturregionen, namentlich einer extrazellulären N-terminale Liganden Erkennungsdomäne, einer einzelnen Transmembran Helix und der C-terminalen zytoplasmatischen Signal-Domäne (Bell et al. 2003). Sie sind sowohl in der äußeren Zellmembran als auch in der Endosommembran lokalisiert (Abbildung 2). Die **extrazelluläre Domäne** (ECD) bindet spezifisch Liganden. TLR sind Glykoproteine mit einer Größe von 550-800 Amino-säuren. Die ECD ist eine Aneinanderreihung von sich bis zu 29-mal wiederholenden Leucin-reichen Tandemmustern (LRR, *leucinrich repeats*, LXXLXXLXLXXN, L: Leucin, N: Asparagin, X: beliebige Aminosäure). Einzelne LRRs bilden eine Schleife und werden durch nach innen gerichtete, in definierten Abständen konservierte hydrophobe Reste (XØXXØX4FXXLX Motiv; F: Phenylalanin, X: beliebige Amino-säure, Ø: hydrophobe Aminosäure) stabilisiert (Zou et al. 2009, Loo und Gale 2011). Zusammen bilden LRRs eine kennzeichnende hufeisenförmige Struktur (Kobe und Kajava 2001). Verbunden wird die intra- und

extrazelluläre Domäne durch eine die Membran durchspannende α -Helix, bestehend aus 20 ungeladenen, meist hydro-phoben Resten. Die **intrazelluläre Domäne** der Toll/Interleukin-1 Rezeptor (TIR) ähnelt der namensgebenden zytosolischen Domäne von IL-1 Rezeptoren. Während die Struktur der LRRs zwischen den einzelnen TLR ligandenspezifisch variiert, ist die intrazelluläre Domäne hoch konserviert. Auch in Pflanzen konnte ein Homolog zur TIR Domäne identifiziert werden, welche zum Schutz vor Pathogenen dient (Burch-Smith und Dinesh-Kumar 2007). Dies weist auf eine hoch konservierte urtümliche Funktion und Form hin, die sich mit der Evolution in alle Stämme verbreitet, aber wenig verändert hat.

Charakteristisch für die TIR-Domäne ist eine aus fünf alternierenden α -Helices und β -Strängen bestehende Struktur (Xu et al. 2000, Bell et al. 2003, Chan et al. 2010). Sie besteht aus 150 Aminosäuren und gliedert sich in drei konservierte Regionen (Box 1, 2 und 3). Für die Signalweiterleitung ist die sogenannte BB-Schleife entscheidend, die in Box 2 lokalisiert ist (Brikos und O'Neill 2008). Über diese binden TLR spezifische Adaptermoleküle, was die Signaltransduktion initiiert. Bisher waren fünf **Adapterproteine** namentlich MyD88 (*myeloid differentiation factor 88*), TRIF/Ticam-1 (*TIR domain-containing adaptor inducing interferon- β*), Tram/Ticam-2 (*TRIF related adaptor protein*) und SARM (*sterile- α and HEAT/armadillo motifs-containing protein*) bekannt. Doch kürzlich wurde ein neuer Adapter, namentlich BCAP Adapter (*B cell adaptor for phosphoinositid-3-kinase (PI3K)*) identifiziert (Takeda und Akira 2004).

1.2.7 Akzessorische Proteine und Signalwege

Nach ligandenspezifischer Bindung dimerisieren die TLR meist zu Homodimeren mit Ausnahme von TLR2, der Heterodimere mit TLR1 und TLR6 bilden kann (Ozinsky et al. 2000). Dies führt zu einer allosterischen Konformationsänderung der TIR Domäne (Colonna 2007), die anschließend mit der TIR Domäne des für den TLR spezifischen Adapter interagiert. Die induzierten **Signalwege** werden in zwei Reaktionsketten unterteilt, die im Fall von TLR3 und TLR4 über TRIF bzw. bei TLR4 und allen anderen TLR über MyD88 geleitet werden. **MyD88** vermittelt eine Phosphorylierung und so die Aktivierung von Kinase der IL-1 Rezeptor-assoziierten-Kinase (IRAK) Familie, IRAK1 bis 4 (Abbildung 3) (Takeda und Akira 2004). Über diesen Komplex wird der TNF-Rezeptor-assoziierte Faktor 6 (TRAF6) ubiquitiniert,

der zwei distinkte Signalwege einleiten kann. Zum einen werden über den TAK1-Komplex die MAP-Kinasen phosphoryliert, die zur Induktion von Genen der pro-inflammatorischen Zytokine wie IL-6, IL-12, TNF und IL-1 β führen und zum anderen wird die Phosphorylierung des IKK-Komplexes, bestehend aus IKK- α , IKK- β und IKK- γ eingeleitet. Dies induziert die Aktivierung von NF κ B durch Phosphorylierung des Inhibitors I κ B, der in ruhendem Zustand an die Untereinheiten p50, p52 und p56 gebunden ist und somit die Zellkerntranslokation blockiert. Der zweite Signalweg führt über die Rekrutierung der IRF-Familie (Interferon regulierenden Faktor) zur Induktion von Typ-I Interferonen über IRF1 und -7 sowie in Abhängigkeit von IRF5 zur Produktion von inflammatorischen Zytokinen (Colonna 2007, Coban et al. 2010). Das Adapterprotein **TRIF** wird hingegen von lediglich zwei TLR rekrutiert. Befunde zur Produktion von IFN- β über einen MyD88 unabhängigen Signalweg führten 2005 zur Identifikation und Charakterisierung von TRIF. Über die Aktivierung von TLR3 und in einer zweiten Signalkaskade auch über TLR4 werden über IRF3 und -7 sowohl IFN- β wie auch proinflammatorische Zytokine durch NF κ B induziert (Kawai und Akira 2010, Small et al. 2013). Ein weiterer TRIF abhängiger Signalweg, der zur Induktion von NF κ B führt, läuft über die Rekrutierung eines C-terminal lokalisierten Rezeptor-Interaktions-Proteins (RIP, *receptor interacting protein*) und eines N-terminalen TRAF6.

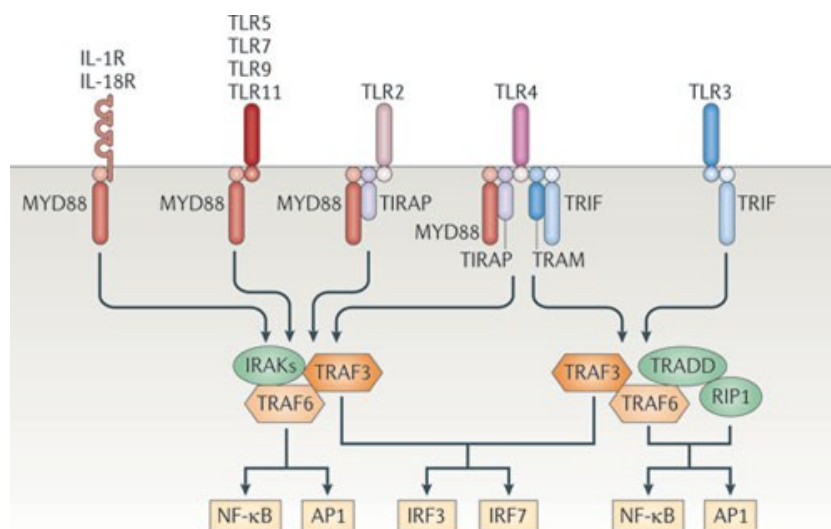


Abbildung 3: IL-1 Rezeptoren und TLR rekrutieren die gleichen Adaptermoleküle. Die IL-1 Rezeptoren wie TLR5, 7, 8, 9, 10, 11, 12 und 13 interagieren nach Aktivierung exklusiv mit MyD88. TLR2 und TLR4 rekrutieren zusätzlich zu MyD88 TIRAP und TRAM, während TLR3 TRIF rekrutiert (Hacker et al. 2011).

MyD88 und TRIF sind essentielle Adaptermoleküle in der Signalweiterleitung von aktivierten TLR, während MAL/TIRAP und TRAM als Brücke zwischen TLR und dem Adaptermolekül fungieren (Abbildung 3). Im Fall von MyD88 ist MAL/TIRAP für die Induktion von NF κ B nach Aktivierung von TLR2 und TLR4 durch bakterielle Komponenten essentiell (Horng et al. 2002, Myong et al. 2009). MAL interagiert mit der intrazellulären Domäne von TLR1, -2 und -4, aber nicht mit der von TLR6. Weiter deuten die erhobenen Daten darauf hin, dass MAL für die Kettenreaktion nach TLR2 Aktivierung nicht so bedeutend ist und einen inhibitorischen Effekt auf den Signalweg von TLR3 hat (Van Opdenbosch et al. 2014). TRAM hingegen interagiert als Schalter für TLR4 und TRIF und induziert IRF3-abhängig die Induktion von Typ-I Interferonen (Lai und Weisblum 1971, Small et al. 2013). Dieser zweite Signalweg von TLR4 wird über die Aktivierung von TRIF-MyD88 induziert, was zu einer Endozytose von TLR4 führt und über das Endosom den TRAM-TRIF Signalweg aktiviert (Kagan et al. 2008, Tanimura et al. 2008).

Die Untersuchung von Mäusen defizienten für die Adapterproteine MyD88 oder TRIF beantwortet die Frage, ob in einer untersuchten Entzündungsreaktion z. B. auf virale oder bakterielle Pathogene TLR bzw. IL-1 Rezeptoren involviert sind. MyD88 ist essentiell beteiligt in die Signalkaskade der damals noch Waisen (*orphan*) TLR sowie IL-1 Rezeptoren (Adachi et al. 1998). Ein weiteres Protein, dessen *knock-out* bei der Suche nach involvierten TLR hilfreich ist, stellt das die endosomalen TLR vom endoplasmatischen Retikulum (ER) zum Endosom transportierende *polytopic endoplasmic reticulum-resident membrane protein* (Unc93B1) dar. Es handelt sich um ein hoch konserviertes, die Membran 12-fach durchspannendes Transmembranprotein mit zwei Glykosylierungsstellen am N-Terminus (Kashuba et al. 2002, Brinkmann et al. 2007).

Die strikte Eingrenzung der intrazellulären TLR auf das Endosom schützt vor der ungewollten Erkennung körpereigener Nukleotide, die sich ständig im extrazellulären Raum befinden. TLR3, -7, -8, -9, -11, -12 und 13 werden von dem Chaperon Unc93B1 zum Endolysosom transportiert (Itoh et al. 2011, Lee et al. 2014). Im Endolysosomen werden endozytierte Pathogene verdaut und ihre Proteine, Nukleinsäuren und Partikel über die TLR erkannt. Eine Punktmutation (Histidin zu Arginin, H412R) im Protein Unc93B1 (3D) verhindert die Aktivierung von TLR3, -7, -8, -9, -11, -12 und -13 (Tabeta et al. 2006, Brinkmann et al. 2007). Im Endosom werden TLR7, -8 und -9

zu einer aktiven Form verkürzt, um nach Ligandenbindung die Signalweiterleitung zu initiieren (Ewald et al. 2008, Ishii et al. 2014).

1.2.8 Erkennung spezifischer Ligandenmuster

Während die auf der Zellmembran lokalisierten Rezeptoren auf die Erkennung von Proteinstrukturen spezialisiert sind, weisen die endosomal exprimierten TLR eine Affinität zu Nukleinsäuren auf (Tabelle 1).

Tabelle 1: TLR Liganden. Pathogene mit den TLR spezifischen Liganden

TLR	Ligand	Herkunft
TLR1/2	triacylierte Lipopeptide	Bakterien und Mycobakterien
TLR2	Lipoprotein, Peptidoglykan	Gram-positive Bakterien
TLR2/6	diacylierte Lipopeptide,	Mycoplasmen
TLR3	dsRNA, PolyI:C	Viren, Bakterien
TLR4	Lipopolysaccharid (LPS)	Gram-negative Bakterien
TLR5	Flagellin	begeißelte Bakterien, Flagellen
TLR7	ssRNA, R848, Loxoribine, Imiquimod	RNA Viren, Bakterien
TLR8	ssRNA, R848	RNA Viren, Bakterien
TLR9	DNA, unmethylierte CpG DNA	Viren, Bakterien
TLR10	RNA, Proteine	Viren, Plasmodium
TLR11	Profilin, Flagellin	<i>Toxoplasma gondii</i>
TLR12	Profilin	<i>Toxoplasma gondii</i>
TLR13	23S rRNA Segment "Sa19"	Bakterien

TLR2 wurde/wird oft und fälschlicherweise als zentraler Detektor lediglich Gram-positiver Bakterien beschrieben (Takeuchi et al. 1999). Er ist einzigartig unter den TLR, insofern er Heterodimere mit **TLR1** und **TLR6** bildet. Dies gilt als Grund für das weite Spektrum an aktivierenden Liganden von Bakterien, Pilzen, Parasiten und Viren (Ozinsky et al. 2000, Akira et al. 2006, Jin et al. 2007). Als Heterodimer mit TLR1 werden vor allem triacylierte Lipoproteine, Zellwandbestandteile von Gram-negativen sowie -positiven Bakterien bzw. ihr synthetisches Analogon Pam₃CSK₄ erkannt (Müller et al. 2004). Lipoproteine von Mykobakterien und Meningokokken aktivieren TLR2 (Massari et al. 2006, Drage et al. 2010). Er erkennt in Kombination mit TLR6 ein weites Spektrum von diacylierten Lipoproteinen von Bakterien inklusive Mykoplasmen und womöglich auch Lipoteichonsäure (LTA) und Peptidoglycan sowie das Homoglykan Zymosan aus Hefezellwänden (Schwandner et al. 1999, Ozinsky et al. 2000, Takeuchi et al. 2001, Nakamura et al. 2002, Hoebe et al. 2005, Kawai und Akira 2010). Unabhängig von TLR1 und TLR6 ist TLR2 als Homodimer in der Erkennung von Glykoinositolphospholipiden von Parasiten (Campos et al. 2001), Glykolipiden und typischem und atypischem LPS von Bakterien bekannt (Kirschning et al. 1998, Yang et al. 1998, Werts et al. 2001, Girard et al. 2003). Eine Stimulation von endosomalem TLR2 durch Pam₃CSK₄ und LTA aktiviert NFκB.

Zeitgleich mit der Entdeckung, dass die während der Virusreplikation produzierte dsRNA zur einer Immunantwort führt, konnte **TLR3** als verantwortlicher Rezeptor identifiziert werden (Alexopoulou et al. 2001). Es gibt zwei Bindungsdomänen für dsRNA, eine am N-terminalen Ende und eine weitere nahe der Membran proximal am C-Terminus (Wang et al. 2010, Loo und Gale 2011). Nach Aktivierung durch virale RNA oder das synthetische Analogon *Polyinosine-polycytidylic acid* (PolyI:C) induziert TLR3 über TRIF die Expression von Typ-I und Typ-III Interferonen und dadurch die Reifung dendritischer Zellen (Zhou et al. 2009, Pantel et al. 2014).

Der 1997 von Janeway und Medzhitov charakterisierte **TLR4**, wird durch Lipopolysaccharid (LPS), aus Gram-negativen Bakterien aktiviert (Kirschning et al. 1998, Poltorak et al. 1998, Yang et al. 1998, Qureshi et al. 1999). Charakteristisch ist die durch LPS induzierte Interaktion mit dem akzessorischen Protein MD-2 (*Lymphocyte antigen 96*) (Shimazu et al. 1999, Imler und Hoffmann 2001, Latz et al. 2002). Es sind weitere TLR4 Liganden wie z. B. verschiedene Lipid A Analoga, Mannan, virale

Fusionsproteine und das synthetische trimyristoylierte Acylhexapeptid Myr₃CSK₄ zugeordnet worden (Kurt-Jones et al. 2000, Netea et al. 2004, Spiller et al. 2007, Wong et al. 2009). Im Endosom induziert TLR4 nach Stimulation mit *Monophosphoryl lipid A* (MPLA) über den Adapter TRIF proinflammatorische Zytokine (Mata-Haro et al. 2007).

Im Gegensatz zu anderen Toll-ähnlichen Rezeptoren wird **TLR5** nicht von konventionellen dendritischen Zellen (cDCs) oder Mausmakrophagen exprimiert, sondern auf intestinalen Epithelzellen, neutrophilen Granulozyten, klassischen Monozyten und einer spezifischen Klasse von dendritischen Zellen (Uematsu et al. 2006, Shibata et al. 2012). Flagellin, der Hauptbestandteil des Flagellums von allen begeißelten Bakterien, wurde 2001 als Ligand identifiziert (Hayashi et al. 2001). TLR5 wird auch auf dem basolateralem Darmepithel exprimiert und erkennt dort eindringende Bakterien.

Die endosomalen TLR7, -8 und -9 bilden aufgrund ihrer hohen Sequenzhomologie und ähnlichen Kristallstruktur eine separate Untergruppe innerhalb der TLR Familie (Kawai und Akira 2006, Wei et al. 2009). Während erstere zusammen mit dem TLR3 auf die Erkennung von mikrobieller RNA spezialisiert sind, wird TLR9 durch DNA aktiviert. **TLR7** ist auf die Erkennung ssRNA sowohl von Bakterien als auch von Viren spezialisiert. Experimente mit TLR7 *knock-out* Mäusen identifizierten die ssRNA von *Vesicular stomatitis Virus* (VSV) sowie die RNA von Influenzaviren als stimulative Motive (Lund et al. 2004). Weitere Untersuchungen deuten auf eine Involvierung von TLR7 in der Erkennung endogener Retroviren hin (Yu et al. 2012). Zusätzliche Liganden sind kurze molekulare Derivate wie R837 (Imiquimod), R848 (Resiquimod), CL075 (3M-001) (Hemmi et al. 2002) und Loxoribine (Heil et al. 2003). TLR7 wird vor allem von dendritischen Zellen, Makrophagen und in geringer Menge von Monozyten exprimiert und führt nach Aktivierung zur Induktion von Typ-I Interferonen (Gorden et al. 2005, Hornung et al. 2005).

Wie TLR7 weist auch **TLR8** Unterschiede in seiner Funktionalität zwischen Maus und Menschen auf. Obwohl der murine und humane Rezeptor große sequenzielle Ähnlichkeit besitzen, galt ersterer als inaktiv, da er weder auf Konfrontation mit natürlicher, viraler ssRNA noch mit dem synthetischen Imidazoquinolin R848 eine

Immunantwort auslöste (Jurk et al. 2002, Heil et al. 2004, Forsbach et al. 2008). Dies wurde 2006 zunächst durch simultane Stimulation muriner PBMCs mit CL075 und einem polyT Oligonukleotid (ODN) partiell widerlegt (Gorden et al. 2006). Humaner TLR8 wird auch in plasmazytoiden dendritischen Zellen (pDCs) durch DNA des *Vaccinia* Virus aktiviert (Martinez et al. 2010). Dies steht jedoch im Widerspruch zur Untersuchung, der zufolge TLR7 und TLR9, nicht jedoch TLR8, ein erhöhtes Expressionsniveau in pDCs aufweisen (Bauer et al. 2010).

Für den humanen TLR8 (hTLR8) ist hingegen nachgewiesen worden, dass er in myeloiden DCs, Monozyten und Makrophagen nach Aktivierung Typ-I Interferone sowie TNF und IL-12 induziert (Lombardi et al. 2009, Han et al. 2012, Guiducci et al. 2013). Im Gegensatz zum hTLR7 wird hTLR8 durch das Derivat CL075 stimuliert, ebenso von ssRNA40 und R848, wobei letztere für den murinen Rezeptor ineffektiv sind (Jurk et al. 2002, Heil et al. 2004, Gorden et al. 2005). Studien zufolge ist TLR8 auch in die Erkennung von *Borellia burgdorferi*, *Mycobakterium bovis* und *Helicobacter pylori* RNA involviert (Davila et al. 2008, Gantier et al. 2010, Cervantes et al. 2013).

Die fehlende Responsivität von TLR9 defizienten Mäusen auf Konfrontation mit unmethylierter CpG-DNA (Cytosin-phosphatidyl-Guanin) implizierte **TLR9** als deren Rezeptor (Hemmi et al. 2000). Eine Aktivierung von Makrophagen und DCs durch DNA von *Babesia bovis*, *Trypanosoma cruzi* und *T. brucei* wurde ebenfalls über TLR9 induziert (Shoda et al. 2001, Bafica et al. 2006). Synthetische Oligonukleotide, die als Liganden eingesetzt werden, gliedern sich in zwei Klassen. Die Gruppe der A Oligonukleotide werden aus einem palindromen Phosphodiester-Rückrat und einem Phosphorothioat modifizierten 3'-poly-G-Ende gebildet. Zu ihnen gehört ODN 1585, 2216 und 2336, die eine Produktion von Typ-I Interferone und Reifung von pDCs induzieren. Zur Gruppe B gehören die ODN 1668, 2006 und 2007. Sie besitzen eine monomere Phosphorothioat-Struktur mit einem CpG Motiv bestehend aus einem Hexamer. In PBMCs und Splenozyten induziert TLR9 eine erhöhte IL-6 Produktion und fungiert als TH-1 Adjuvans in der Tumorbekämpfung (Dalpke et al. 2002, Vollmer und Krieg 2009). Zusätzlich zu seiner Rolle in der Erkennung von DNA-Motiven konnte Hämozoin, ein Abbauprodukt von Hämoglobin, das von Parasiten wie *Plasmodium falciparum* sekretiert wird, als Ligand von TLR9 identifiziert werden

(Coban et al. 2010), was aber durch die Implikation einer DNA Kontamination von Hämозoin relativiert wurde (Parroche et al. 2007).

1.2.9 Waise (*orphan*) murine TLR

Während **TLR10** in der Maus durch eine retrovirale Insertion inaktiv exprimiert wird, sind Ligandenkandidaten für den lediglich im Menschen funktional exprimierten TLR10 erst in den letzten Jahren impliziert worden. TLR10 wird vor allem in der Niere und den Lymphknoten, in Knochenmark- und Endothelzellen exprimiert. Er gehört zur Gruppe der membranständigen TLR und wurde 2001 kloniert (Chuang und Ulevitch 2001, Verma et al. 2014). Bereits 2013 wurde die Rolle von TLR10 in der Induktion von Apoptose durch Peptidoglykan Gram-positiver Bakterien untersucht (Mulla et al. 2012, Lee et al. 2014). In humanen Makrophagen wurde die Genexpression von TLR10 nach Konfrontation mit dem Influenza Virus aufreguliert und die Autoren implizierten einen RNA-Protein-Komplex als aktivierendes Motiv (Lee et al. 2014).

Für die folgenden in der Maus vorkommenden drei Rezeptoren TLR11, -12 und -13 wurden ebenfalls erst in den letzten Jahren spezifische Liganden identifiziert. Zunächst wurde angenommen, dass es sich bei **TLR11** um einen in der Plasmamembran gebundenen Rezeptor handelt. Mehrere Untersuchungen und die Unc93B1-Abhängigkeit deuten jedoch auf eine endosomale Lokalisation hin (Pifer et al. 2011). Es ist der bisher einzige endosomale Rezeptor, für den Proteine und nicht Nukleinsäuren als Liganden impliziert wurden, wie das Profilin-ähnliche Protein von *Toxoplasma gondii*. Weitere Untersuchungen mit *TLR11*^{-/-} Mäusen beschreiben eine erhöhte Suszeptibilität gegenüber Niereninfektionen, hervorgerufen durch uropathogene Bakterien und eine erhöhte Infektionsrate durch *Salmonella typhimurium* und *S. typhi* (Zhang et al. 2004, Yarovinsky et al. 2005, Mathur et al. 2012).

Zusätzlich wurde eine Interaktion von TLR11 mit **TLR12** nachgewiesen, die nach Aktivierung durch Profilin von *T. gondii* Heterodimere bilden (Andrade et al. 2013, Koblansky et al. 2013).

Bis 2012 konnte dem murinen **TLR13** kein Ligand zugeschrieben werden (Kawai und Akira 2011). Da es sich um einen endosomal exprimierten Rezeptor handelt, wurden Nukleinsäuren als mögliche Liganden vermutet. 2012 postulierten wir und nachfolgend weitere Gruppen, dass TLR13 eine hoch konservierte Sequenz der 23S ribosomalen RNA (rRNA) von Bakterien erkennt, die im Peptidyl-Transferaseloop (katalytische Zentrum des Ribosoms) liegt (Hidmark et al. 2012, Li und Chen 2012, Oldenburg et al. 2012). Diese Entdeckung wird in der vorliegenden Arbeit detailliert beschrieben.

1.3 RIG-I-ähnliche Rezeptoren (RLRs)

Die zytoplasmatischen RLR (*RIG-like receptors*) gehören zu den Superfamilie-2 (SF2) Helikasen/ATPasen, die eine essentielle Rolle in der Erkennung viraler RNA spielen (Abbildung 2). Innerhalb der Superfamilie-2 unterscheiden sich 10 Gruppen in Form und Funktion voneinander, teilen jedoch sieben konservierte Sequenzmotive. Zur Gruppe der Immunantwort induzierten RIG-ähnlichen Helikasen gehören RIG-I, MDA5 und LGP2 (Abbildung 4). Diese Gruppe der ubiquitär vorkommenden Rezeptoren sind hauptverantwortlich für die Immunantwort bei Virusinfektionen.

1.3.1 Struktur

Während RIG-I und MDA5 eine ähnliche Struktur aufweisen, weicht LGP2 in einigen Domänen ab (Abbildung 4). Die N-terminalen Caspase Rekrutierungsdomänen (CARDs), die zur Signalweiterleitung durch Rekrutierung anderer Proteine dient, fehlen LGP2 (Kang et al. 2002, Yoneyama et al. 2004). Alle drei besitzen eine zentrale, ATPase abhängige DExD-Box und am C-terminalen Ende eine regulatorische/Repressor Domäne (*regulatory/repressor domain*, RD). Letztere verhindert die Autoaktivierung in Abwesenheit von viraler RNA und enthält eine Bindestelle für den RIG-I Liganden (Saito et al. 2007, Cui et al. 2008, Takahasi et al. 2008). Die Aktivierung von RIG-I durch verschiedene Viren führt zur Induktion von Typ-I Interferonen (IFN- α , IFN- β) und proinflammatorischen Zytokinen.

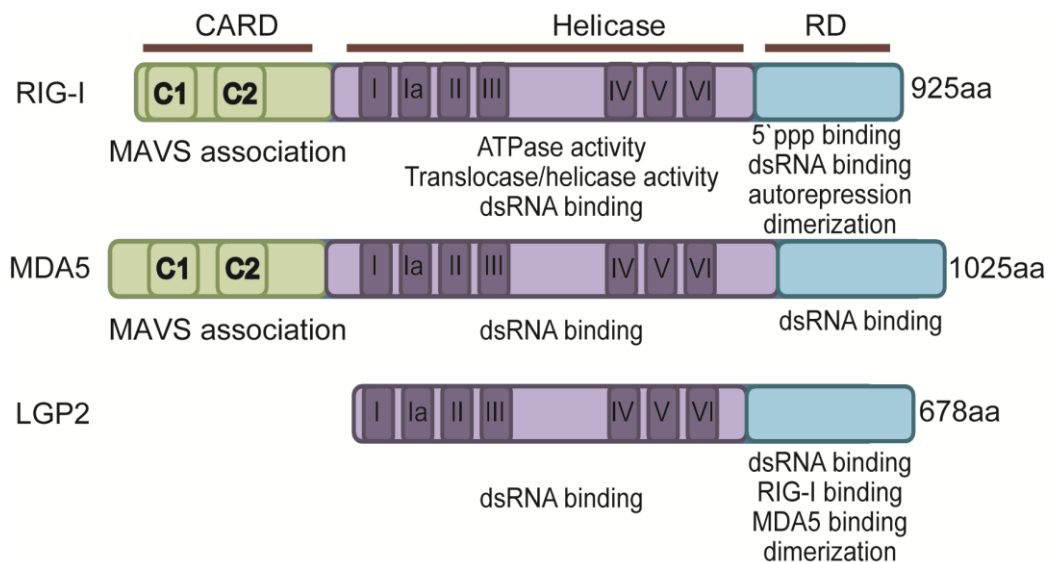


Abbildung 4: Domänenstruktur der RIG-like Helikasen. Der Aufbau von RIG-I (925 AS) und MDA5 (1025 AS) ist ähnlich mit zwei CARD (*caspase recruitment domain*) Domänen, einer zentralen ATPase aktive DExH/D-Box Helikase Domäne und eine Repressor Domäne (RD). Die Struktur von LGP2 (678 AS) ist um die CARD-Domänen reduziert, weist aber noch die DExH/D-Box Helikase und die Repressor Domäne auf (Baum und Garcia-Sastre 2010).

1.3.2 LGP2

LGP2 wurde erstmals 2005 beschrieben und gilt im Gegensatz zu MDA5 und RIG-I als negativer Regulator RIG-I induzierter Signalwege. Dies wird durch die Tatsache unterstützt, dass LGP2 die zur Interaktion mit dem Adapterprotein IPS-1 notwendigen CARD-Domänen fehlen (Rothenfusser et al. 2005, Yoneyama et al. 2005).

Neuere Untersuchungen mit Paramyxoviren bestätigen die inhibitorische Wirkung von LGP2 auf RIG-I. Nach Bindung eines spezifischen viralen Proteins an LGP2 bildete dieses zusammen mit RIG-I einen Komplex, der die Bindung der PAMPs an RIG-I verhinderte (Childs et al. 2012). Dies steht in Kontrast zu den von Satoh et al. (2010) erhobenen Daten, welchen zufolge LGP2 eine stimulierende Wirkung auf MDA-5 und RIG-I haben soll. Welche Funktion LGP2 in Zusammenarbeit mit MDA-5 und RIG-I für das Immunsystem übernimmt, ist unklar.

1.3.3 MDA5

1999 wurden Gene untersucht, die im Zusammenhang mit Tumorzellwachstum und Differenzierung stehen (Huang et al. 1999). Nach der Behandlung mit IFN und TNF wurde MDA5 als aufreguliertes Gen in humanen HO-1 Melanomzellen entdeckt. Die N-terminalen CARD-Domänen von RIG-I und MDA5 weisen eine 25%ige bzw. 40%ige Homologie zur Helikase Domäne auf (Barral et al. 2009). Im Gegensatz zu RIG-I bindet MDA5 lange dsRNA Sequenzen mit einer Länge von über 1000bp (Kato et al. 2006) sowie das synthetische hmw (*high molecular weight*) Poly I:C (Yoneyama und Fujita 2009, Takeuchi und Akira 2010). Als viraler Rezeptor detektiert er die namensgebenden 20-30 nm kleinen Picornaviren (Gitlin et al. 2006, Feng et al. 2012), Novoviren (McCartney et al. 2008) und mit RIG-I überschneidend Reoviren und das Dengue Virus (Loo et al. 2008). Das genaue Motiv des MDA5 Liganden wurde jedoch noch nicht beschrieben.

Neuere Studien belegen zudem die Hypothese, dass MDA5 in der Induktion von Diabetes Typ I (Diabetes mellitus) eine Rolle spielt. Eine Mutation im MDA5 kodierenden Gen *ifih1* schützt vor viral induzierten Immunerkrankungen durch eine verminderte MDA5 Expression (Lincez et al. 2015).

1.3.4 RIG-I

Namensgebend für RIG-I waren Untersuchungen in Zellen aus Promyelozytenleukämien, die mit All-trans-Retinsäure behandelt wurden (Sun 1997). Erst sieben Jahre später wurde die Rolle von RIG-I als wichtiger PRR entdeckt, der nach Erkennung von viraler RNA die Induktion von Typ-I Interferonen aktiviert (Yoneyama et al. 2004). RIG-I gehört zu den Multidomänen-Proteinen mit einer Länge von 925 Aminosäuren, die in Vertebraten hoch konserviert sind und auch in einigen Invertebraten vorkommen (Zou et al. 2009). Trotz der ähnlichen Struktur binden MDA5 und RIG-I unterschiedliche RNA Motive sowie verschiedene Virenarten. Zu ihnen gehören die Influenza-, die Phlebo- (*Rift valley fever*, Riftalfieber), Japanische Enzephalitis-Viren (JEV), Ebola, Vesicular Stomatitis (VSV) und Hepatitis C Viren (Yoneyama und Fujita 2007, Satoh et al. 2010, Loo und Gale 2011). Trotz der hohen Affinität zu ssRNA erkennt RIG-I auch dsRNA, aber vorzugsweise kurze RNA Sequenzen (Saito und Gale 2008, Vela et al. 2012). Im Gegensatz zu MDA-5

wird RIG-I daher durch das lmw (*low molecular weight*) PolyI:C aktiviert. Als natürliches Motiv wurde 2006 eine triphosphorylierte ssRNA impliziert, die in den meisten negativen RNA Viren vorkommt (Hornung et al. 2006) oder eine poly-U-Sequenz (Saito et al. 2008). Fluoreszenzaufnahmen konnten die Wanderung von rekombinantem RIG-I entlang einer 25 nt langen dsRNA darstellen (Myong et al. 2009).

Im Gegensatz dazu postulieren zwei unabhängige Gruppen die Notwendigkeit von einem Monophosphat am 5`Ende der RNA (Pichlmair et al. 2006, Takahasi et al. 2008). Weitere Untersuchungen implizierten die Beteiligung von RIG-I in der Erkennung von Gram-positiv bakterieller RNA wie jener von *Listeria monocytogenes* (Hagmann et al. 2013) sowie die stimulierende Wirkung der mRNA des Gram-negativen Bakteriums *Salmonella enterica serovar typhimurium* (Schmolke et al. 2014).

1.3.5 RIG-I induzierter Signalweg

Die als Repressor Domäne fungierende CTD interagiert in inaktivem Zustand mit der CARD Domäne, um diese zu blockieren. Durch Kristallstruktur-Analysen konnte die Interaktion einer positiv geladenen Tasche in der CTD von RIG-I mit 5`-triphosphorylierter RNA beobachtet werden, was zu einer Konformationsänderung führte (Saito et al. 2007, Cui et al. 2008, Lu et al. 2010). Im aktivierten Zustand interagiert die N-terminale CARD-Domäne mit der CARD-Domäne des Adaptermoleküls IPS-1 (Cardif, MAVS, *mitochondrial antiviral-signaling protein*) (Meylan et al. 2005) und induziert die Ubiquitinierung von TRAF3 (*TNF-receptor associated factor 3*), der daraufhin mit TBK1 (*TANK-binding kinase 1*) und IKKi (*inducible I κ B kinase*) einen Komplex bildet. Über TANK (*TRAF family member-associated NF κ B activator*), NAP1 (*NAK-associated protein 1*) und SINTBAD (*similar to NAP1 TBK1 adaptor*) werden die Transkriptionsfaktoren IRF3 und -7 phosphoryliert. Nach Bildung von Homo- und Heterodimeren translozieren diese in den Zellkern und induzieren die Synthese von Typ-I Interferonen (Kawai et al. 2005, Guo und Cheng 2007, Takeuchi und Akira 2010, Kumar et al. 2011, Freaney et al. 2013, Liu et al. 2013). Parallel dazu interagiert IPS-1 zusätzlich mit FADD (*FAS-associated protein with death domain*) und RIP-1 (*receptor-interacting protein*), was zur Translokation von NF κ B und IRF3 sowie zur Induktion von AP-1 (*activator protein 1*) über MAP- (*mitogen-activated protein*) Kinasen führt (Kawai et al. 2005, Jiang et al. 2014).

1.4 Zielsetzung

Auch heute noch stellen akute Infektionen mit pathogenen Bakterien eine große Bedrohung dar. Durch Antibiotika-Therapie werden die Bakterien oft erfolgreich abgetötet, wodurch es aber zu einer Überschwemmung durch freigesetzte Proteine, Lipoproteine und Nukleinsäuren bzw. immunistimulative PAMP kommt. Die daraufhin ausgelöste Überreaktion des Immunsystems führt oft zu Multiorganversagen und folgend zum Tod. Es konnte gezeigt werden, dass die spezifische Blockade von TLR2 und TLR4 und gleichzeitiger Antibiotikabehandlung Mäuse vor einer Gram-negativ bakteriell induzierten sonst tödlichen Sepsis schützt (Spiller et al. 2008).

In dieser Arbeit sollten Sensoren für Gram-positive Bakterien identifiziert werden. Untersuchungen meiner Vorgängerin Ruth Ferstl grenzten durch die Demonstration einer MyD88-Abhängigkeit bei gleichzeitiger Nicht-Involvierung von IL-1 Rezeptoren (IL-18) TLR als Hauptrezeptorkandidaten für die Erkennung von *Staphylococcus aureus* ein. Mögliche Kandidaten waren die endosomalen murinen Rezeptoren TLR11, -12 und -13, für die bis dahin noch keine spezifischen Liganden beschrieben wurden. Die Eingrenzung des zuständigen Rezeptors und des stimulierenden Prinzips stellten das Ziel des ersten Teils dieser Arbeit dar.

Da die Rezeptoren TLR11, -12 und -13 von der Maus, aber nicht vom Menschen exprimiert werden, war die Fragestellung des zweiten Projekts, welcher Rezeptor im Mensch die Rolle des Sensors der RNA von Gram-positiven Bakterien über- oder einnimmt.

Wir beobachteten, dass trotz Sequenzidentität von Sa19 in *S. aureus* und *Escherichia coli* Gram-negative RNA TLR13 nicht aktivierte, als ob dessen Total-RNA hemmend auf TLR13 wirkt. Auf der Suche nach einer Positivkontrolle in Bezug auf Gram-negativ bakterielle Total-RNA wurden wir in RIG-I fündig. Während Gram-negative RNA RIG-I aktivierte, war Gram-positive RNA diesbezüglich inaktiv. Die Identifikation der RIG-I aktivierenden Aktivität in Gram-negativer RNA war das Ziel des dritten Projektteils.

2 Material & Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte, Verbrauchsmaterial und Zubehör

Absaugpumpe	Knf lab
Agarose Gelelektrophoresekommer, Sub Cell	Bio Rad
Agarose Gelgießstand	Bio Rad
Agarosegeldokumentation	Intas UV-Systeme
Chemilumineszenz Imaging, Fusion Fx7	Vilber
Elektrophoresekommer, Mighty Small SE250/260 Vertikal	Heofer
Inkubationsschüttler, KS 400i	IKA
Kühl-/ Gefrierschränke	Liebherr
Luminometer, Orion II	Berthold
Magnetrührer, SB 162	Stuart
Mikroplatten (ELISA)-Reader, Epoch	BioTek
Mikroplatten-Wascher 12 well	BioTek
Mikroskop, Axiovert 40C	Zeiss
Mikrowelle MW 800	Continent
Minitischzentrifuge	Biozym
Multifuge X3R Haereus	Thermo Scientific
pH-Meter	Mettler
Photometer	Eppendorf
Pipetierhilfe	Hirschmann, Brandt
Pipetten	Eppendorf, Gilson

Real-Time PCR-System 7500 Fast	Applied Biosystems
Reinstwasseranlage, Easypure II Anlage	Werner Reinstwassersysteme
Rolltaumler, RM5	CAT
Schüttler, Polymax 1020/1040	Heidolph
Semi-dry Trans-Blot® Turbo™	Bio Rad
Spannungsquelle	Bio Rad, Hoefer
Sterilwerkbank, HERA safe	Thermo Scientific
Thermocycler	Eppendorf
Thermomixer	HCL Toledo
Ultraschallbad	Ultrasonic Clean VWR
Vortexer, VTX-3000L	LLG
Waage, Acculab	Sartorius group
Wasserbad	GFL
Zellinkubator, HERA cell	Thermo Scientific
Zentrifuge, Heraeus Fresco 17	Thermo Scientific

2.1.2 Chemikalien und Lösungsmittel

Alle verwendeten Chemikalien und Lösungsmittel entsprachen dem höchsten Reinheitsgrad und sind im Folgenden alphabetisch geordnet aufgeführt.

79i	TIB MolBiol
Accutase	PAA
Adenosin-5`-Triphosphat (ATP)	Sigma-Aldrich
Agarose	Roth
Ammoniumperoxidsulfat (APS)	Roth

Ampicillin	Sigma-Aldrich
Antibiotika / Antimykotika	PAA
Bafilomycin A1	Sigma-Aldrich
Beta-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich
Bovine Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich
Bovine Serum Albumin (BSA) für PCR	Promega
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Roth
Chloroform	Roth
Chloroquin	Sigma-Aldrich
Ciap, <i>Calf intestinal alkaline phosphatase</i>	New England Biolabs
CL075 (3M002)	Invivogen
Coelenterazin	PJK
Coenzym A	PJK
CpG-DNA (1668)	MWG
Curdlan	Wako
Cytochalasin D	Sigma-Aldrich
Desoxyribonukleotide (dNTPs)	Thermo Scientific
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Thermo Scientific
Dimethylsulfid (DMSO)	Sigma-Aldrich
Dithiotreitol (DTT), für reverse Transkription	Promega
D-Luciferin	PJK
DMEM Medium	Gibco
DNA Ladepuffer 5x	Thermo Scientific
DNA Leiter 1kb	Thermo Scientific
DNase I, RNase-free	Thermo Scientific
Dotap	Roche

EDTA Dinatriumsalz Dihydrat ($\text{Na}_2\text{EDTA} \times 2\text{H}_2\text{O}$)	Sigma-Aldrich
Ethanol 70%	Apotheke UK Essen
Ethanol, absolut 99,8% (v/v)	Roth
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Roth
<i>Fetal Calf Serum</i> (FCS)	Gibco
Flagellin	Invivogen
G418 Neomycin	PAA
Galactose	Sigma-Aldrich
Gentamicin	Sigma-Aldrich
Glucose	Sigma-Aldrich
Glycerol	Roth
Glycin	Roth
GM-CSF haltiger Überstand	eigene Herstellung
HEPES	Roth
<i>Horse Serum</i>	PAA
Interferon γ , rekombinant murin/ human	Peptrotech
IRAK4 Inhibitor	Calbiochem
Isopropanol	VWR
Kaliumchlorid (KCl)	Roth
Kaliumhydrogenphosphat (K_2HPO_4)	Merck
Kanamycin	Stratagene
Kompetente Zellen, DH5a	Invitrogen
Kompetente Zellen, XL-10 Gold	Stratagene
Lipofectamine 2000/ 3000	Life Technologies
Lipofectamine® RNAiMAX	Life Technologies
Lipopolysaccharid, <i>E. coli</i> 0111:B4	Sigma-Aldrich

Loxoribine	Invivogen
Luzigenin	Enzo Life Science
LyoVec	Invivogen
Magnesiumcarbonathydroxid ((MgCO ₃) ₄ Mg(OH) ₂)	Sigma
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Roth
Magnesiumsulfat (MgSO ₄)	Roth
Methanol	Apotheke UK Essen
Natriumazid (NaN ₃)	Roth
Natriumchlorid (NaCl)	Roth
Natriumorthovanadat (Na ₃ VO ₄)	Roth
Natriumphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Roth
Nonident P-40 (NP-40, IGEPAL CA-630)	Roth
<i>Normal Goat Serum</i> (NGS)	Invitrogen
Oligo (dT) 18 Primer	Fermentas
Opti-MEM Glutamax	Invitrogen
Pam ₃ CSK ₄ (Tripalmityl-SysteinyI-Seryl-Tetralysin)	EMC Microcollections
PBS, Dulbecco, steril	Gibco
PBS, Dullbecco, Trockensubstanz	Biochrom
Penicillin-Streptomycin	PAA
PhenylmethyIsuflonylfluorid (PMSF)	Roth
Phorbo-12-myristat-13-acetat (PMA)	Calbiochem
Phosphatase Inhibitor Cocktail 2	Sigma-Aldrich
Phosphorsäure (H ₃ PO ₄)	Sigma-Aldrich
Polyinosinic:Polycytidylic Acid (PolyI:C)	Sigma-Aldrich
Imw / hmw	
Poly-L-Arginin (pLA)	Sigma-Aldrich

Polymyxin B	Sigma-Aldrich
Primer, PCR	MWG
Primer, qPCR	Qiagen
Proteinase K	Qiagen
Reporter Lysepuffer	Promega
Resiquimod (R848)	Invivogen
RNA 5' Pyrophosphohydrolase (RppH)	New England Biolabs
RNA 5' Polyphosphatase	Epicentre
RNA, 5'ppp-dsRNA	Invivogen
RNase A	Sigma-Aldrich
RNase Away Spray	VWR
RNase Inhibitor, RiboLock	Fermentas
Roti Store Cryoröhrchen	Roth
Roti-Aqua-Phenol	Roth
RPMI Medium	Gibco
Saccharose	Sigma-Aldrich
Salzsäure (HCl)	Roth
Schwefelsäure (H ₂ SO ₄)	Roth
ssRNA40/Lyovec	Invivogen
Streptavidin-HRP	R&D Systems
Sulfanilamid	Sigma-Aldrich
SybrSafe	Invitrogen
Terminator™ 5'-Phosphate- Dependent Exonuclease	Epicentre
TLR2 Antikörper (T2.5)	Hycult
TMB ELISA Substrate Reagent Set	BD
Tri Reagent	Sigma-Aldrich

Trichloressigsäure (TCA)	Roth
TriFast, peqGold	Peqlab
Tris	Roth
Trypsin (1x in PBS)	PAA
<i>Tumor Necrosis Factor</i> (TNF), murin rekombinant	Peptrotech
TurboFect	Thermo Scientific
Tween 20	Roth
Uridine	Sigma-Aldrich

2.1.3 Kitsysteme

BCA Protein Assay Kit	Pierce
ELISA DuoSet	R&D Systems
Invisorb® Fragment CleanUp	Strattec
NucleoBond Xtra Maxi Plus	Macherey-Nagel
OptEIA TMB <i>Substrate Reagent Set</i>	BD Biosciences Wizard Plus
peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I	peqLab
QIAquick Gel Extraction	Qiagen
QIAquick PCR <i>Purification Kit</i>	Qiagen
SV Minipreps DNA <i>Purification Systems</i>	Promega
Western ECL	PerkinElmer

2.1.4 Größenstandards und Enzyme

Alkaline Phosphatase, <i>Calf Intestinal alkaline phosphatase</i> (Ciap)	Promega
--	---------

DNA-Größenstandard RiboRuler 1kb	Fermentas
DNA-Polymerase, Go-Taq	Promega
DNA-Polymerase, Pfu	Fermentas
DNase I	Fermentas
Dpn I	Thermo Scientific
Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix	Fermentas
Proteinase K	Qiagen
Protein-Größenstandard, Page Ruler Prestained	Fermentas
Restriktionsenzyme	Thermo Scientific
	New England Biolabs
Reverse Transkriptase	Fermentas
Shrimps Alkalische Phosphatase (SAP)	Fermentas
T4 DNA Ligase	Fermentas

2.1.5 Puffer und Lösungen

Alle Medien, Puffer und Lösungen wurden mit destilliertem Wasser aus der Easypure II Anlage angesetzt. Vor Gebrauch wurden sämtliche Puffer und Medien autoklaviert. Hitzelabile Komponenten wurden sterilfiltriert.

DEPC-H ₂ O	0,1 % (v/v)	DEPC
	Über Nacht schütteln, Autoklavieren	
Griess Reagenz A	0.1 %	N(-1-Naphthyl) ethylendiamindihydrochlorid

Griess Reagenz B	1 %	Sulfanilamid
	5 %	Phosphorsäure
HBS, 2x	42 mM	Hepes
	273,78 mM	NaCl
	9,9 mM	KCl
	1,5 mM	Na ₂ HPO ₄
		pH 7,1
PBS	10 g/l	Dulbecco PBS Trockensubstanz
PBT	10 g/l	Dulbecco PBS
	0,05 % (v/v)	Tween 20
TE-Puffer	10 mM	Tris, HCl
	1 mM	EDTA
		pH 8,0
TAE-Puffer, 50x	242 g	Tris

2.1.5.1 Puffer für die Gelelektrophorese

Sammelgel	2 % (v/v)	Acrylamid 30 % (29:1)
	0,125 M	Tris-HCl, pH 6,8
	0,25 % (v/v)	SDS
	5 µl	Temed
	25 µl	APS 10%
Trenngel	10 % (v/v)	Acrylamid 30 % (29:1)
	3,75M	Tris-HCl, pH 8,8
	0,1 % (v/v)	SDS
	5 µl	Temed
	50 µl	APS 10%
Laemmli Laufpuffer	29 g	Tris
	10 %	
	144 g	Glycin
	10 g	SDS
	ad 1 l H ₂ O _{bidest.}	

2.1.5.2 Western Blot

Gris Glycin Puffer 10 %	58 g	Tris
	144 g	Glycin
	10 g	SDS
	Ad 1 l H ₂ O _{bidest.}	

2.1.5.3 ELISA

<i>Blocking-Puffer</i>	PBS	
	50 g/l	Saccharose
	10 g/l	BSA
	50 mg/l	NaN ₃
<i>Reagent Diluent</i>	1x	PBS
	10 g/l	BSA
Stop-Lösung	1 M	H ₂ SO ₄

2.1.5.4 Luciferase-Assay

1x Reporter Lyse-Puffer	1 ml	5x Reporter Lysis Buffer
	4 ml	H ₂ O
Luciferase-Substrat	470 µM	D-Luciferin
	270 µM	Coenzym A
	33 mM	DTT
	530 µM	ATP
	1.07 mM	(MgCO ₃) ₄ Mg(OH) ₂
	2.67 mM	MgSO ₄
	20 mM	Tricine
	0.1 mM	Na ₂ EDTA
		pH 7,8, Dunkel lagern

Renilla-Substrat	1,1 M	NaCl
	2.2 mM	Na ₂ EDTA
	220 mM	KHPO ₄
	1.3 mM	NaN ₃
	440 µg/ml	BSA
	1.43 µM	Coelenterazin
		pH 5.0

2.1.5.5 Lysepuffer für Mausgewebe

Lysepuffer	100 mM	Tris-HCl
	5 mM	EDTA
	200 mM	NaCl
	0,2 % (v/v)	SDS
	20 mg/ml, frisch	Proteinkinase K

2.1.5.6 Zellkulturzusätze

1x Trypsin-EDTA	5 ml	10x Trypsin-EDTA
	45 ml	PBS
Accutase	1:1	in PBS
Neomycin (G418)	60 mg/ml	in H ₂ O

2.1.6 ELISA Kits

Tabelle 2: Murine Elisa Kits

Name	Hersteller
mIL-1 β	R&D DuoSet
mIL-6	R&D DuoSet
mTNF	R&D DuoSet

Tabelle 3: Humane Elisa Kits

Name	Hersteller
hIL-1 β	R&D DuoSet
hIL-6	R&D DuoSet
hIL-8	R&D DuoSet
hIL-12p40	R&D DuoSet
hTNF	R&D DuoSet
hIFN α , Matched Antibody Pairs,	eBioscience

2.1.7 Antikörper und Konjugate für den Western Blot

Tabelle 4: Primäre und Sekundäre Antikörper

Name/ Antigen	Spezies	Verdünnung	Hersteller
<i>RIG-I</i>	Rabbit	1:1000	Cell signaling
<i>MAVS/ IPS-1</i>	Rabbit	1:1000	Cell signaling
<i>P-IRF3</i>	Kaninchen	1:500	New England Biolabs
Rabbit, IgG, HRP	Ziege	1:5000	Cell signaling

2.1.8 Oligonukleotide und Liganden

Alle Genotypisierungsprimer wurden von MWG-Biotech bezogen und auf eine von der Firma angegebenen Konzentration von 100 pmol/μl mit H₂O_{bidest.} eingestellt. Für die *Real-Time* PCR wurden Primer der Firma Qiagen (QuantiTect) oder selbst synthetisierte Primer von MWG geordert. Stimulierende und inhibierende Oligonukleotide und Liganden wurden mit RNase-freiem H₂O angesetzt.

Tabelle 5: Primer zur Genotypisierung

Primer	Sequenz	Annealing
TLR2		
3518	5'-CTTCCTGAATTTGTCCAGTACAGG-3'	59°C
3519	5'-TCGACCTCGATCAACAGGAGAAGGG-3'	
3195	5' GGGCCAGCTCATTCTCCCACTCAT-3'	
TLR3		
c	5'CCAGAGCCTGGGTAAGTTATTGTGCTG-3'	62°
b	5'-TCCAGACAATTGGCAAGTTATTCGCCC-3'	
c	5'-ATCGCCTTCTATCGCCTTCTTGACGAG-3'	
TLR4		wildtyp
F-mT4	5'-GTTTAGAGAATCTGGTGGCTGTGGAGAC-3'	60°C
3'tmmt4	5'-TATATGCGGCCGCTCATCTGCTGTACTTTTTACAGCC-3'	<i>knock-out</i>
R-mT4 mut	5'-TGTTGGGTCGTTTGTTCGGATCCGTCG-3'	67°C
TLR7		
wt	5'-ACGTGATTGTGGCGGTCAGAGGATAAC-3'	62°C
Extra	5'-CCAGATACATCGCCTACCTACTAGACC-3'	
Neo	5'-ATCGCCTTC TATCGCCTTCTTGACGAG-3'	
TLR9		
Forward	5'-GAAGGTTCTGGGCTCAATGGTCATGTG-3'	67°C
Reverse	5'-GCAATGGAAAGGACTGTCCACTTTGTG-3'	

3D		
Forward	5'- GGGAGTTAATACCAGGAGACCCAG -3'	60°C
Reverse	5'-ATGCTAACAGTTCTGAGCCACCTAG -3'	

Tabelle 6: Primer für die *Real-Time* PCR

Primer	Name/ Sequenz	Hersteller
<i>β-Aktin</i>	Mm_Actb_1 SG QuantiTect Primer Assay Mm_Actb_2 SG QuantiTect Primer Assay	Qiagen
<i>GAPDH</i>	Hs_GAPDH_1 SG QuantiTect Primer Assay	Qiagen
<i>mhMapK1</i>	Hs_MAPK1_1 SG QuantiTect Primer Assay	Qiagen
<i>mTlr13</i>	Mm_TLR13_1 SG QuantiTect Primer Assay	Qiagen
<i>hTlr8</i> sense	5'-GAGCATCAACCAAAGCAAGA-3'	MWG
<i>hTlr8</i> antisense	5'-TGCCGTAGCCTCAAATACTG-3'	MWG
18S rRNA sense	5'-GTAACCCGTTGAACCCCAT-3'	MWG
18S rRNA antisense	5'-CCATCCAATCGGTAGTAGCG-3'	MWG

Tabelle 7: Primer für die Mutagenese

Name	Sequenz	TM
TLR13 Mut a		70,8°C
Forward	5`-atcatgtacttggGccacagccctaggtcac-3`	70,9°C
Reverse	5`-ctagggctgtggCccaagtacatgatgctg-3`	
TLR13 Mut b		67,8°C
Forward	5`-gtacttggGccacagccctaggtc-3`	68°C
Reverse	5`-tagggctgtggGccaagtacatgatgc-3`	
TLR13		69,5°C
Forward	5`-cagagaataactctggaagtgggtttgaaagctgg-3`	69,5°C
Reverse	5`-tgggtaggtttccgagcaggtgacaaacag-3`	

Tabelle 8: Inhibitoren

Name	Konzentration	Firma
Chloroquin	5 µg/ml	Sigma
Cytochalasin D	1 µg/ml	Sigma
T2.5	20 µg/ml	Hycult biotech
TLR78i - 957	TsGsC sTsTsG sAsCsA sTsCsC sTsGsG sGsGsT sTsGsT	TIB Molbiol
T8i	5'-TCC TCC TTG AGI-3'	Dynavax

Tabelle 9: siRNA

siRNA	ID	Firma
TLR13	SI01449518	Qiagen
MapK1	SI1022564	Qiagen
scramble	SI1027310,	Qiagen
TLR8	SI02642458	Qiagen
scramble	SI1027280	Qiagen

2.1.9 Vektoren

Tabelle 10: Leervektoren

pFlagCMV-1	P CMV, PSV40, hGH pA, preprotypsin leader, fl ori, ampR, Flag	Expressionsvektor mit 5'-Flag Epitop	Sigma
pRK7	P CMV, PSV40, P SP6, SV40 pA, pUC ori, Flag, lacZ, lacI, ampR	Expressionsvektor mit 5'-Flag Epitop	U. Schindler

pRK7	P CMV, PSV40, P SP6, SV40 pA, pUC ori, Myc, lacZ, lacI, amp	Expressionsvektor mit 5'-Myc Epitop	U. Schindler
pGL-2	Fl ori, luc, SV40 pA, ori, ampR	Reporterplasmid (leer), Luciferasegen	Promega
pJet1.2	ampR	<i>Blunt cloning Vector</i>	Life Technologies

Tabelle 11: Vektorkonstrukte

Name	Konstrukt	Herkunft
pFlag-CMV-1 mTLR2	Enthält die komplette cds von mTLR2. Die Klonierung erfolgte über NotI und BamHI.	C.Kirschning H.Wesche
pFlag-CMV-1 mTLR3	Enthält die komplette cds von mTLR3. Die Klonierung erfolgte über NotI und Sall.	C. Kirschning H. Wesche
pcDNA3 mTLR7	Enthält die komplette cds von mTLR7. Die Klonierung erfolgte über NotI und Sall.	S. Bauer
pUNO mTLR8	Enthält die komplette cds von mTLR8. Die Klonierung erfolgte über AgeI und NheI	Invivogen
pcDNA3 mTLR9	Enthält die komplette cds von mTLR9. Die Klonierung erfolgte über NotI und Sall.	S. Bauer
pUNO mTLR11	Enthält die komplette cds von mTLR11.	Invivogen
pUNO mTLR12	Enthält die komplette cds von mTLR12	Invivogen
pUNO mTLR13	Enthält die komplette cds von mTLR13	Invivogen
mRIG-I	Enthält die komplette cds von mRIG I	A. Krug

mMDA5	Enthält die komplette cds von mMDA5	A. Krug
pFlag-CMV-1 hTLR8	Enthält die komplette cds von mTLR8.	C. Kirschning
6x NFκB-TK-luc	Enthält das Reportergen für Luciferase hinter einem Block aus 6 NFκB Bindungsstellen	C. Kirschning
pIFNβ-luc	Enthält das Reportergen für Luciferase nach der Promotorsequenz von IFNβ	A. Krug
phRL-null	Enthält das Luciferase Co-Reportergen Renilla	Promega

2.1.10 Zellkultur

2.1.10.1 Zelllinien

HEK293, humane, embryonale Nierenzellen 293 (*human embryonic kidney cells*, ATCC-Nr. CRL-1573): Diese adhärenenten fibroblastenähnlichen Zellen wurden mit Teilen des humanen Adenovirus 5 infiziert und sind leicht zu transfizieren.

RAW264.7 Makrophagen (*mouse leukaemic monocyte macrophage cell line*, ATCC-Nr. TIB-71): Die semi-adhärenenten Zellen wurden aus murinen durch intra-peritoneale Injektion des Abelson Leukaemia Virus (A-MuLV) verursachten Tumoren gewonnen.

NIH-3T3-ISRE-Reporter Zellen, 3-Tages-Transfer Inokulum 3×10^5 Zellen (*mouse embryonic fibroblast cells*): Diese Zelllinie wurde aus NIH (National Institutes of Health, Bethesda) Swiss Mausembryonen gewonnen. Das Lenti *Interferon-stimulated response element* (ISRE) Reporter-Element ermöglicht die Untersuchung der induzierten Typ-I Interferon Aktivität.

THP-1 (*human leukemia cell line*): Die monocytoide Zelllinie wächst in Suspension und wurde aus dem peripheren Blut eines Patienten mit akuter myeloischer Leukämie (AML) isoliert. Sie wird vor allem für Immunozytochemische Analysen, Protein-Protein Interaktionen sowie immunohistochemische Verfahren eingesetzt.

U937 (*human leukemic monocyte lymphoma cell line*): Die myeloiden Suspensionszellen stammen aus Zellen eines Pleuraerguss eines Patienten mit diffusen histiozytaren Lymphom. Sie verhalten sich wie Monozyten und lassen sich zu Makrophagen ausdifferenzieren.

2.1.10.2 Zellkulturmedien

BMDM	DMEM: 4,5 g/l Glucose, L-Glutamin,
Differenzierungsmedium	10% (v/v) FCS
	1% (v/v) Pen-Strep
	1% (v/v) A/A
	50 µM β- Mercaptoethanol
	10-15% (v/v) L-Zellüberstand (M-CSF)
BMDM	DMEM: 4,5 g/l Glucose, L-Glutamin,
Differenzierungsmedium in	20% (v/v) FCS
Teflonbeutel	1% (v/v) <i>horse serum</i>
	1% (v/v) Pen-Strep
	1% (v/v) A/A
	5 mM β-Mercaptoethanol
	15 % (v/v) L-Zellüberstand (M-CSF)
BMDM Medium	DMEM: 4,5 g/l Glucose, L-Glutamin,
	2/10% (v/v) FCS
	1% (v/v) Pen-Strep
	1% (v/v) A/A
	50 µM β-Mercaptoethanol
siRNA Medium I	RPMI: 4,5 g/l Glucose, L-Glutamin,
	2 g/l NaHCO ₃

siRNA Medium II	RPMI: 4,5 g/l Glucose, L-Glutamin, 2 g/l NaHCO ₃ 20% FCS 0,01 mol/L HEPES 0,1 mmol/l β-Mercaptoethanol
HEK293 Medium	DMEM: 4,5 g/l Glucose, L-Glutamin, 2/10% (v/v) FCS 1% (v/v) Pen-Strep 1% (v/v) A/A
hPBMCs	DMEM: 5% (v/v) hitzeinaktiviertes Serum 1% (v/v) Pen-Strep 1% (v/v) A/A
NIH-3T3-ISRE	DMEM: 4,5 g/l Glucose, L-Glutamin, 2/10% (v/v) FCS 1% (v/v) Pen-Strep 1% (v/v) A/A 1% (v/v) G418
THP-1 / U937	RPMI: 4,5 g/l Glucose, L-Glutamin, 2/10% (v/v) FCS 1% (v/v) Pen-Strep 1% (v/v) A/A

2.1.11 Bakterien – Medien und Stämme

2.1.12 Medien

BHI-Medium	37 g/l <i>brain heart infusion</i> Autoklavieren Zugabe des Antibiotikums: 10 µg/l Erythromycin
LB Medium	10 g/l Bacto-Trypton 5 g/l Hefeextrakt 10 g/l NaCl pH 7,0 (NaOH) Autoklavieren Zugabe des entsprechenden Antibiotikums: 50 mg/l Ampicillin 10 mg/l Kanamycin
LB Platten	10 g/l Bacto-Trypton 5 g/l Hefeextrakt 10 g/l NaCl 20 g/l Agar pH 7,0 (NaOH) Autoklavieren Zugabe des entsprechenden Antibiotikums: 50 mg/l Ampicillin 10 mg/l Kanamycin

Tabelle 12: Kompetente Bakterien

Name	Eigenschaft	Herkunft
DH 5 α	endA1, hsdR17, rK-mK+, supE44 THI-1, recA1, gyrA, NalR, relA1, acZYA-argF, U169 (f80lacZdM15)	Invitrogen
XL10-Gold	TetR, D(mcrA)183, D (mcrCB-hsdSMR-mrr) 173, endA1, supE44, thi (1, recA1, gyrA96, relA1, lac, Hte [F' proAB lacIqZDM15, Tn10 (TetR), Amy CamR	Stratagene

Tabelle 13: Bakterienstämme

Name	Stamm	Herkunft
<i>Bacteroides fragilis</i>	DSMZ 1396	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkultur
<i>Bacillus subtilis</i>	DSMZ 23778	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkultur
<i>Escherichia coli</i>	29898	Thomas Miethke
<i>Listeria monocytogenes</i>	DSMZ 15675	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkultur
<i>Moraxella catarrhalis</i>	DSMZ 11994	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkultur
MRSA, Methicillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>	Klinisches Isolate	J. Steinmann

<i>Salmonella enterica</i>	Klinisches Isolat	Thomas Mietke
<i>Staphylococcus aureus</i>	DSMZ 20231	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkultur
<i>Streptococcus pneumonia</i>	D39	Thomas Miethke
<i>Haemophilus influenzae</i>	DSMZ 10001	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkultur

2.1.13 Mäuse

Die Mäuse wurden unter pathogenfreien Bedingungen in den Tierställen des Universitätsklinikums Essen gehalten. Die eingesetzten *knock-out* Mäuse wurden mindestens neunmal auf den genetischen Hintergrund von C57/BL6 zurückgekreuzt.

2.1.14 Liganden

Zur Kontrolle wurden die eingesetzten Zellen mit spezifischen Liganden stimuliert. Somit wurde die Responsivität der Zellen, entsprechende *knock-out* Zellen sowie die chemische Inhibition überprüft und / oder bestätigt.

Tabelle 14: Liganden und eingesetzte Konzentrationen

Rezeptor	Ligand	Konzentration
TLR2	LPS Pam ₃ CSK ₄	0,1 oder 1 µg/ml
TLR4	LPS	0,1 µg/ml
TLR7	CL075 R848 Loxoribine	2,5 µg/ml 5 oder 10 µg/ml 600 µM
TLR8	CL075	2,5 µg/ml

	R848 ssRNA40	5 oder 10 µg/ml 0,5 µg/ml
TLR9	1668	10 µM
TLR13	Sa19	1 pmol
MDA 5	Poly(I:C)	10 µg/ml
RIG I	Poly(I:C) lmw 5`ppp-RNA	10 µg/ml 200 ng

2.1.15 Verwendete Software

BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)	NCBI
Excel, Word, Office	Microsoft
Illustrator, Photoshop, Acrobat	Adobe
Prism	Graphad
Serial Sequencer	serialbasics

2.2 Zellbiologische Methoden

Die Kultivierung aller nachfolgend aufgeführten Zelllinien fand in einem Inkubator bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit statt. Die eingesetzten Medien und Puffer wurden vor Verwendung in einem Wasserbad auf 37°C vorgewärmt. Für die Langzeitlagerung wurden die Zellen wie beschrieben abgelöst, bei 800 g für 5 min zentrifugiert und in 10%igem DMSO-FCS Gefriermedium gelöst, in Kryo-Röhrchen aliquotiert und bei -80°C oder in Stickstofftanks gelagert. Zum Einsatz der Zellen im Assay wurde die Zellzahl mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer bestimmt.

2.2.1 Kultivierung von *human embryonic kidney* 293 Zellen (HEK293)

Die Aussaat der HEK293 Zellen erfolgte auf 15 cm Zellkulturschalen in HEK293 Medium 10% FC. Nach Erreichen der gewünschten Zelldichte (80-90% Konfluenz) wurde das Medium abgesaugt, der Zellrasen mit 5 ml PBS gewaschen und mit 5 ml 1x Trypsin von der Zellkulturschale abgelöst. Durch Zugabe von 10%igem Medium wurde der Trypsin-Verdau gestoppt und die Zellen für die weitere Kultivierung 1:3 oder 1:5 auf eine neue 15 cm Schale überführt.

2.2.2 Kultivierung von RAW264.7 Makrophagen

Die RAW264.7 Zellen wurden ebenfalls auf 15 cm Zellkulturschalen kultiviert. Es wurden ausschließlich Plastikpipetten im Umgang mit RAW264.7 Makrophagen verwendet, um Kontaminationen durch Rückstände in Glaspipetten zu vermeiden. Die semi-adhärenenten Zellen wurden analog zu den HEK293 Zellen bis zu einer annähernden Konfluenz herangezogen, nach Absaugen des Mediums in 5-10 ml frischem Medium von der Platte gespült und auf eine frische Zellkulturschale überführt.

2.2.3 Kultivierung und Ausdifferenzierung von THP-1 Zellen

Die Suspensionszellen wurden in Zellkulturflaschen kultiviert und bei Erreichen einer Konfluenz von 80-90% in eine neue Zellkulturflasche in 25 ml frischem Medium ausgesät. Zur Differenzierung der monozytoiden Zellen zu Makrophagen wurden 1×10^7 Zellen pro 96 well Platte in 25 ml Medium von 200 nM PMA (*phorbol 12-myristate 13-acetate*) ausgesät. Ein Mediumwechsel, ohne PMA, wurde nach 24 h und nach 48 h vorgenommen. Acht Tage ausdifferenzierte Zellen wurden weitere fünf Tage kultiviert.

2.2.4 Isolierung humaner mononukleärer Zellen (hPBMC)

Die mononukleären Zellen des peripheren Bluts (*peripheral blood mononuclear cells*, PBMCs) wurden aus heparinisiertem Vollblut von gesunden Spendern per Dichtegradientenzentrifugation isoliert. Die Blutbeutel wurden von der lokalen

Blutbank von Prof. Horn zur Verfügung gestellt. Die Verwendung wurde durch das Ethikkomitee (14-5804-B0, Universitätsklinikum Essen) genehmigt. In 50 ml Falcons wurden 20 ml Ficoll mit 12 ml Vollblut überschichtet und anschließend für 30 min bei 400 g (ohne Bremse) zentrifugiert. Die obere gelbfarbene Schicht, das Blutserum, wurde entnommen und für die Kultivierung der Zellen hitzeinaktiviert (30 min. 55°C). Die mononukleären Zellen befinden sich in einem erkennbaren weißen Ring, der vorsichtig in ein neues Falcon überführt und mit PBS zum Waschen auf 50 ml aufgefüllt wurde. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (30 min 8500 g) konnten das Zellpellet in frischem Medium resuspendiert und über ein Zellsieb (verhindert die Aggregation der Zellen) in ein weiteres Falcon überführt werden. Nach Bestimmung der Zellzahl wurden die isolierten hPBMCs ausgesät (5×10^7 Zellen pro 96 well Platte) oder bei -80°C in DMSO (10% DMSO in autologem Serum) eingefroren.

2.2.5 Gewinnung von murinen primären Knochenmarks-makrophagen (BMDM)

Zum besseren Verständnis der angeborenen Immunabwehr in vitro fanden murine Makrophagen (*bone marrow derived macrophages*, BMDMs) aus dem Knochenmark entsprechender Genotypen Verwendung. Die Mäuse wurden durch zervikale Dislokation getötet, die Extremitäten präpariert und die Knochen vom Fleisch befreit. Die Röhrenknochen, Femur, Tibia und Humerus wurden anschließend unter sterilen Bedingungen an den Enden geöffnet und mit BMDM Medium in ein 50 ml Falcon mit Hilfe einer Kanüle ausgespült. Das Knochenmark wurde je nach Verwendungszweck wie folgt differenziert.

2.2.5.1 Konventionelle Differenzierung zu Makrophagen auf Zellkulturplatten

Die Knochenmarkszellen wurden nach der Präparation durch Zentrifugation (800 rpm, 5 min) pelletiert und in 25 ml Differenzierungsmedium auf 15 cm (unbeschichteten) Petrischalen ausgesät. Die Ausdifferenzierung der Zellen erfolgte für 6-8 Tage, wobei nach drei Tagen 10 ml frisches Medium hinzugefügt wurde. Zur weiteren Verwendung wurde das Medium abgesaugt, die adhärennten Makrophagen mit 5 ml PBS gewaschen und mit 5 ml Accutase bei 37°C für 5-10 min abgelöst. Durch Zugabe von 10%igem BMDM-Medium wurde die Accutase-Aktivität gestoppt,

die Zellen wurden pelletiert und in frischem Medium resuspendiert. Zur weiteren Verwendung wurde die Zellzahl für die Aussaat eingestellt.

2.2.5.2 Differenzierung der Knochenmarkszellen im Teflonbeutel

Die Präparation der Beutel und Ausdifferenzierung der Knochenmarkszellen erfolgte wie beschrieben (Wiese et al. 2010). Dies erleichterte das Ablösen der Makrophagen mit dem Ziel, die Zellen weder durch chemische Zusätze noch durch mechanisches Abspülen zu stressen, um eine bessere Transfektionsrate zu erreichen. Lumox-Folie (25 μm , 305 mm, Sarstedt) wurde zunächst zugeschnitten (25x10 cm), gefaltet und mittels Polystar Magnet-Tischschweißgerät wurde die lange sowie eine kurze Öffnung zugeschweißt, um einen Beutel zu erhalten. Die hydrophobe Seite lag dabei innen. Nach Autoklavieren wurden die fertigen sterilen Beutel in Aluminiumfolie aufbewahrt. Zur Differenzierung der Knochenmarkszellen wurden die Zellen direkt nach Präparation gezählt und in 50 ml Medium 6×10^6 Zellen pro Beutel ausgesät. Die Beutel mit den Zellen wurden mit Beutel-Clips verschlossen und 6-7 Tage im Inkubator bei 37%, 10% CO_2 und 95% Luftfeuchtigkeit ausdifferenziert. Anschließend wurden die Beutel für 30 min auf Eis gelegt, alle 10 min gewendet und die Zellen vorsichtig durch Reiben mit zwischen den Fingern abgelöst. Für die weitere Verwendung wurden die Zellen in 50 ml Falcons gesammelt, durch Zentrifugation (800 g, 5 min, 4°C) pelletiert, in frischem Medium resuspendiert und die Zellzahl bestimmt.

2.2.6 Elektroporation von primären Makrophagen mit siRNA

Die im Beutel ausdifferenzierten Makrophagen wurden wie beschrieben geerntet und gezählt. Für die siRNA wurden 2×10^6 Zellen pro Elektroporationsansatz verwendet, wovon jeweils 4×10^5 Zellen pro *well* ausgesät wurden. Die Zellzahl wurde für einen gesamten Versuch berechnet und entsprechend entsprechende Volumen an Zellsuspension zentrifugiert. Das Pellet wurde in dem entsprechenden Volumen Opti-MEM resuspendiert. Ein Elektroporationsansatz setzte sich dabei wie folgt zusammen:

10 µl (200 pmol)	siRNA (20µM)
50 µl	Zellsuspension
40 µl	Opti-MEM
Final 100 µl	

Der Ansatz wurde in sterilen 4 mm Küvetten der Firma Biorad pipettiert und mit nachfolgenden Parametern elektroporiert:

Parameter	<i>Exponential Protocol</i>
	400V
	150 µF
	100 Ω

Direkt nach Elektroporation wurden die zusammengehörigen Ansätze in 15 ml Falcons in entsprechendem Volumen Medium I gepoolt und ausgesät (100 µl pro well). Dieses Medium enthielt kein Serum, um die Aufnahme der siRNA durch die Makrophagen zu erleichtern. Nach einer Inkubation von 30 min (37°C, 10% CO₂) wurden 100 µl Medium II hinzugegeben, um ein Endvolumen von 200 µl zu erreichen. Nach 24 und 48 h wurde das Medium durch frisches Medium ersetzt. Die Stimulation erfolgte in 2%-igem FCS. Der Überstand wurde für den Stickstoffmonoxid- und ELISA-Assay auf Zell-überstandsplatten überführt, die Zellen wurden in Trizol (100 µl pro well) bei -80°C gelagert.

2.2.7 Bestimmung der Stickstoffmonoxid Konzentration

Makrophagen setzen nach Aktivierung nicht nur Zytokine, sondern auch Stickstoffmonoxid (NO) frei. Da NO ein instabiles Radikal ist, wird mit Hilfe der Griess-Reaktion der Farbumschlag durch die Bildung eines rotvioletten Azofarbstoffs photometrisch gemessen. Dabei entsteht Nitrit (NO₂). Es wurden 50 µl der zu untersuchenden Zellkulturüberstände zu 50 µl einer 1:1 Mischung der Griess Reagenzien A und B überführt. Der Farbumschlag wurde nach einer 10 min Inkubation in Dunkelheit bei 540 nm gemessen und die Konzentration anhand einer Natriumnitrit Standardkurve bestimmt.

2.2.8 **Enzyme linked immunosorbent assay - ELISA**

Neben dem Stickstoffmonoxid-Assay ist der ELISA-Assay eine weitere Methode zum Nachweis von aktivierten Immunzellen. Nach erfolgreicher Stimulation werden Zytokinen sowie Chemokine freigesetzt, die über spezifische Antikörper-Antigen-Antikörper Bindung (*sandwich-ELISA*) im Zellkulturüberstand sowie im Lysat nachgewiesen werden können. Die gewonnenen Überstände wurden mittels ELISA Kits analysiert.

Zunächst wurde der Primärantikörper (*capture antibody*) in PBS verdünnt auf speziell behandelten ELISA 96 *well* Platten über Nacht gebunden. Am Folgetag wurden nicht gebundene Antikörper durch dreimaliges Waschen mit PBT (300 µl pro *well*) mit einem Mikroplatten-*Washer* entfernt und unspezifische Bindungen für 1 h mit *Blocking*-Puffer (200 µl pro *well*) blockiert. Die Proben und der jeweilige Standard wurden nach erneutem Waschen in einem finalen Volumen von 50 µl unverdünnt oder verdünnt mit *Reagent Diluent* aufgetragen und für 1,5 h bei 37°C unter schwenken inkubiert. Anhand der Standardkurve können die im Überstand oder Lysat untersuchten Proteine quantifiziert werden. Nach erneutem Waschen wurden 50 µl des biotinylierten Sekundärantikörpers (*detection antibody*) in *Reagent Diluent* verdünnt und aufgetragen. Nach einer Inkubationszeit von 1,5 h bei 37°C wurden die Platten gewaschen und Meerrettich-Peroxiase (*horse radish peroxidase*, HRP) konjugiertes Streptavidin (1:200 in *Reagent Diluent*) zugegeben (30 min, bei 37°C). Nach einem finalen Waschschrift wurden 50 µl des Substrates 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) aufgetragen. Bei Antikörperbindungen wird das Substrat enzymatisch durch HRP aktiviert und es kommt zu einem blauen Farbumschlag. Die Reaktion erfolgte im Dunkeln und wurde nach Erreichen der entsprechenden Signalstärke (blaue Farbentwicklung) mit 25 µl H₂OSO₄ (Stopp-Lösung) abgestoppt, wodurch ein erneuter gelber Farbumschlag erfolgte. Mittels Mikroplatten-*Reader* wurde Extinktion bei 450 nm gemessen und ausgewertet.

2.2.9 **Luziferase Reportergen Assay**

Das Luziferase Reportergensystem ermöglicht in Abhängigkeit von Rezeptor spezifischer Stimulation die Untersuchung der Messung der Aktivierung eines Transkriptionsfaktors und Promotors. Die zu untersuchende regulatorische Sequenz

wurde dafür vor das Luziferase-Gen des Leuchtkäfers (*Photinus pyralis*) und als Kontrolle für die Transfektionseffizienz vor das Gen der Oktokorallenart (*Renilla reniformis*) kloniert.

Zur Transfektion von HEK293 Zellen wurde pro 96 *well* Platte 2×10^6 Zellen in je 200 μ l Medium ausgesät und für mindestens 4 h bei 37°C inkubiert. Die zu untersuchenden Rezeptoren wurden mittels Calcium-Phosphat transfiziert. Ein Transfektionsansatz für eine 96 *well* Platte setzte sich wie folgt zusammen:

660 μ l	H ₂ O	
90 μ l	2 M CaCl ₂	
0,2 μ g	<i>Nfκb</i>	2 ng/ <i>well</i>
	<i>lfnβ</i>	15 ng/ <i>well</i>
0,63 μ g	phRL-null	6,3 ng/ <i>well</i>
	Rezeptor	2-50ng
	pRK5 (Leervektor)	ad 50ng

1:1 unter Vortexen in 2xHBS pipetiert

Nach einer Inkubationszeit von 20 min bei RT erfolgte die Transfektion durch Applikation von 15 μ l pro *well* und einer Inkubation von 16 h unter Standardbedingungen. Anschließend wurde das Medium (2% FCS) ersetzt und die transfizierten Zellen für 16 h stimuliert, das Medium entfernt und die Zellen in Reporter Lyse-Puffer (40 μ l pro *well*) für 1 h (800 rpm) bei Raumtemperatur lysiert. 20 μ l dieses Zelllysates wurden auf eine weiße Mikroplatte überführt und die Licht-Emission durch Umsetzung des Substrates D-Luziferin in einem Orion II Luminometer gemessen. Die Zugabe von jeweils 50 μ l Substrat erfolgte automatisch im Luminometer.

Die Transfektion von RAW264.7 Zellen erfolgte mit Hilfe von TurboFect *Transfection Reagent*. Auf eine 96 *well* Platte wurden 2×10^6 Zellen ausgesät und wie beschrieben kultiviert. Der Transfektionsansatz setzte sich pro Well wie folgt zusammen:

0,4 µl	Turbofect	
20 µl	Opti-MEM	
1,2 µg	<i>Nfkb</i>	120 ng/well
0,63 µg	phRL-null	6,3 ng/well
	Rezeptor	2-50 ng
	pRK5 (Leervektor)	ad 50 ng

Die Zellen wurden nach einer Inkubationszeit von 20 min bei Raumtemperatur mit 20 µl des Ansatzes transfiziert. Die Zellen wurden in 2% FCS haltigem Medium für 16 h stimuliert.

2.2.10 Hitzeinaktivierung von Bakterien

Die zur Stimulation verwendeten Bakterien wurden durch Erhitzen inaktiviert. Die entsprechenden Bakterien wurden dafür in 500 ml des entsprechenden Mediums bei 37°C mit 180 rpm bis zum Erreichen der exponentiellen Phase kultiviert. Anschließend wurden die Bakterien pelletiert (15 min, bei 6000 g) und in sterilem PBS resuspendiert. Dieser Waschschrift wurde zweimal wiederholt. Das Pellet wurde in einem Verhältnis 1/10 oder 1/100 zum Volumen der Originalkultur aufgenommen und in Falconröhrchen überführt. Um die Konzentration der hitzeinaktivierten Bakterien bestimmen zu können, wurden diese vor der Inaktivierung auf Blutagar-Platten titriert. Nach Inkubation von 16 h bei 37°C wurden resultierende Kolonien gezählt und die Konzentration wie folgt berechnet:

$$\text{Kolonienzahl} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 50 = \text{cfu/ml (colony forming units)}$$

Zur Inaktivierung wurden die Bakterien für 20 min in kochendem Wasser inkubiert und anschließend in Aliquots bei -80°C gelagert.

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 DNA Isolation aus Mausgewebe

Zur Überprüfung der eingesetzten Genotypen wurde den Mäusen die Schwanzspitze abgenommen und in 500 µl Lysis Puffer über Nacht bei 55°C unter Schütteln verdaut. Um die DNA aus dem Lysat zu isolieren, wurde nach Zentrifugation (10 min, 13000 rpm) der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit gleichem Volumen Isopropanol aufgefüllt und zur DNA Fällung gut gemischt. Der Überstand wurde nach erneutem Zentrifugieren vorsichtig abgenommen und das DNA-Pellet in 500 µl 70% Ethanol gewaschen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt und Entfernen des Ethanols konnte das DNA-Pellet getrocknet und in 50 µl H₂O gelöst werden. Dieser Schritt wurde durch eine Inkubation bei 55°C für 10 min beschleunigt. Die DNA wurde in gelöster Form bei 4°C kurz gelagert oder direkt zur Genotypisierung eingesetzt.

2.3.2 Transformation von Bakterien

Zur Replikation von Plasmid-DNA wurden chemisch-kompetenten Bakterien (*E. coli* Stamm DH5α oder XL10 Gold) mittels Hitzeschock transformiert. Dazu wurden 10 ng - 1µg Plasmid DNA in einem Maximalvolumen von 5 µl mit 40 µl chemisch kompetenter Zellen gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde das Gemisch für 40 sec bei 42°C inkubiert (Hitzeschock) und erneut für 2 min auf Eis gelagert. Nach Zugabe von 960 µl vorgewärmtem LB0-Medium (37°C) wurden die Zellen für 1 h bei 37°C geschüttelt. Nach einem Zentrifugationsschritt (5000 rpm, 5 min) wurden 900 µl Überstand entfernt, das Zellpellet in dem verbliebenen Medium resuspendiert und auf vorgewärmten Agar-Platten (37°) unter Zugabe des entsprechenden Selektions-Antibiotikums ausplattiert. Über Nacht wurden die Platten bei 37°C inkubiert.

2.3.3 Präparation von Plasmid DNA aus Bakterien

Die Isolation der Plasmid DNA erfolgt über eine Silica-Gel Membran, wobei die DNA von zellulären Proteinen, RNA und weiteren interferierenden Substanzen ge-

reinigt wird. Die photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte mittels einer Eppendorf μ Cuvette bei einer Wellenlänge von 260 nm. Der Quotient $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ sollte 1,8 bei reiner DNA betragen, da eine Verunreinigung der DNA durch Proteine bei 280 nm gemessen werden kann.

Mini Präparation

Für die Präparation wurde das Kitsystem peqGODL Plasmid Miniprep KIT I (Peqlab) verwendet. Von den auf Agar kultivierten mit dem Plasmid transformierten Bakterien wurden Einzelkolonien gepickt und in 3 ml Selektions-Medium über Nacht (37°C, 225 rpm) inkubiert. Von dieser Kultur wurden 2 ml für die Plasmid-Präparation eingesetzt und nach Herstellerangaben behandelt. Vom dem Rest der Kultur wurden Glycerol-Stocks (1:1 v/v) angesetzt und bei -80°C bis zur weiteren Verwendung eingefroren. Die Konzentration der in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ gelösten DNA lag bei ca. 2-3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

Maxi Präparation

Das Kitsystem NucleoBond Xtra Maxi System (Macherey-Nagel) wurde zur Plasmid-Präparation aus großen Bakterienkultur-Volumina eingesetzt. Die von Glycerolstocks oder auf Agar wachsenden Einzelkolonien inokulierte Kultur wurde wie bei der Mini Präparation über Nacht inkubiert. Aus dem Ansatz wurden, sofern nicht vorliegend, Kryostocks hergestellt. Die Aufreinigung erfolgte nach Herstellerangaben. Das DNA-Pellet wurde in einer entsprechenden Menge 600-1000 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ über Nacht bei 4°C gelöst.

2.3.4 TA-Klonierung

Die aus der Total-RNA gewonnene und umgeschriebene cDNA wurde mit Hilfe der für das Gen spezifischen Primer in einer PCR mittels Taq oder Pfu Polymerase amplifiziert. Die durch die Taq-Polymerase generierten DNA-Fragmente enthielten am 3'Ende ein einzelnes Desoxyadenosinmonophosphat, das die Ligation in einen linearisierten Vektor vereinfachte. Nach Herstellerangaben setzte sich ein Ligationsansatz wie folgt in einem Verhältnis von Vektor zu *Insert* 1:3 zusammen:

5 µl	2x Rapid Ligation Buffer
1 µl	Vektor (100 ng)
X µl	PCR-Produkt
1 µl	T4 DNA Ligase (3 U/µl)
ad 10 µl	H ₂ O _{bidest}

Der Reaktionsansatz wurde bei Raumtemperatur für 1 h inkubiert und wie in 2.3.4 beschrieben in chemisch kompetente Bakterien transformiert.

2.3.5 PCR-Aufreinigung

Mittels Invisorb wurden PCR-Produkte aus Restriktionsverdau- und PCR-Ansätzen von Primern, Salzen, Enzymen und Nukleotiden entfernt. Das Protokoll wurde nach Herstellerangaben befolgt und die Konzentration bestimmt. Bis zur weiteren Verwendung wurde die gereinigte DNA bei -20°C gelagert.

2.3.6 Gelextraktion

Zur Identifizierung spezifischer DNA-Fragmente wurde die aus PCR oder Restriktionsverdau gewonnene DNA im Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. In Abhängigkeit der Fragmentgröße wurden 0,5-1,5%ige Gele mit TAE-Puffer hergestellt. Die Fragmentgröße wurde anhand eines 100 bp- oder 1-kb Markers (Fermentas) bestimmt. Unter kurzer UV-Licht Exposition wurde das DNA-Fragment mittels Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Isolation wurde nach Herstellerangaben durchgeführt und die DNA bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

2.3.7 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung der TA-klonierten und subklonierten DNA erfolgte durch die Firma MWG-Biotech, Ebersberg.

2.3.8 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Bei dieser Methode werden durch eine enzymatische Reaktion spezifische Gen-Sequenzen vervielfältigt. Synthetisch designte Oligonukleotide (Primer) flankieren dazu den zu amplifizierenden DNA-Abschnitt und bilden Start und Endpunkt für die DNA-Polymerase. Mit Hilfe der Nukleosidtriphosphate (dNTPs) synthetisiert das Enzym einen komplementären Strang in 5'-3'-Richtung. Für die nachfolgenden PCR Reaktionen wurden je nach Anforderung unterschiedliche Polymerasen verwendet und dementsprechend das PCR-Programm angepasst. Zunächst wurde dazu die doppelsträngige (ds, *double stranded*) DNA durch Erhitzen denaturiert und im nächsten Schritt die Primer mit der einzelsträngige (ss, *singlestranded*) DNA hybridisiert (*Annealing*). Die *Annealing*-Temperatur ist dabei abhängig von der Schmelztemperatur (T_M) der Primer. Die Länge der zu synthetisierenden DNA-Fragmente und die eingesetzte Polymerase bestimmen dabei die Elongationszeit.

2.3.8.1 Genotypisierung

Für die Genotypisierung wurde die aus Mausgewebe gewonnene DNA und eine standardmäßige Taq-Polymerase ohne Korrekturlesefunktion (*proof-reading*) eingesetzt. Das PCR-Programm setzte sich typischerweise aus folgenden Zyklen zusammen:

1.	Initiale Denaturierung	95°C	2 min
2.	Denaturierung	95°C	30 sec
3.	<i>Annealing</i>	48-58°C	45 sec
4.	Elongation	72°C	1 min/kb
5.	Nachsynthese	68-72°C	5 min
6.	Lagerung	4°C	

Die Schritte 2-4 wurden dabei in 30-40 Zyklen mit der für die Primer spezifischen *Annealing*-Temperatur (Tabelle 5) wiederholt.

2.3.8.2 Site-directed Mutagenesis

Die für die Mutagenese notwendigen Sequenzen wurden aus der NCBI Datenbank entnommen und entsprechende Primer mit Hilfe des Serial Sequenzer

erstellt. Diese zielgerichtete Mutagenese verzichtet im Gegensatz zur klassischen Subklonierung auf den Restriktionsverdau und die Ligation. Die Deletion oder Insertionssequenzen sind dabei Bestandteil der Primer, die jeweils vor und nach der Mutationsstelle mit ca. 20 Basenpaaren komplementär zur Zielsequenz synthetisiert werden. Ein Reaktionsansatz enthielt folgende Bestandteile:

5 µl	10x Pfu-Polymerase Puffer
50 ng	Matrizen dsDNA
1 µl	Primer 1 (10µM)
1 µl	Primer 2 (10 µM)
1 µl	dNTP (20 mM)
1 µl	Pfu-Turbo Polymerase (1 U/µl)
ad 50 µl	H ₂ O _{bidest}

Das PCR-Programm setzte sich aus folgenden Schritten zusammen und fand in einem *Thermocycler* statt:

1.	Initiale Denaturierung	95°C	30 sec
2.	Denaturierung	95°C	30 sec
3.	<i>Annealing</i>	54°C	1 min
4.	Elongation	68°C	X min
5.	Nachsynthese	68°C	10 min
6.	Lagerung	4°C	

Die Schritte 2. bis 4. wurden in 20 Zyklen wiederholt, um eine möglichst niedrige Fehlerrate zu erreichen. Die Synthesedauer setzte sich dabei aus der eingesetzten Polymerase und der Größe des zu amplifizierenden Vektors zusammen. Im Anschluss wurde das Ausgangsplasmid durch Zugabe von 1 µl Dpn 1 und einer Inkubationszeit von 1 h bei 37°C entfernt, da das Enzym ausschließlich methylierte DNA schneidet, wodurch das neusynthetisierte, mutierte Plasmid erhalten bleibt. Durch nachfolgende DNA-Fällung wurde die DNA-Konzentration angereichert, um die Effizienz der Transformation zu steigern. Dazu wurde der PCR-Ansatz in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und wie folgt komplementiert:

50 µl	PCR-Produkt
190 µl	H ₂ O
24 µl	NaAcetat (3 M; pH5,2)
520 µl	EtOH 100%

Die DNA wurde bei -20°C für 1 h gefällt und im Anschluss pelletiert (20 min, 13000 rpm, 4°C). Das Pellet wurde in 1 ml 70%igem EtOH gewaschen, nach einem erneuten Zentrifugationsschritt für 10 min bei 40°C im Heizblock getrocknet und in 5 µl H₂O_{bidest} gelöst. Für die Transformation wurde der kompetente *E. coli* Stamm XL10 Gold eingesetzt. Nach Inokulation einer Minikultur über Nacht und anschließender Mini-Präparation wurde ein Testverdau durchgeführt und positive Plasmide mittels Sequenzierung kontrolliert.

2.3.9 Real-time PCR

Die auf der Polymerase Kettenreaktion basierende *Real-time-quantitative PCR* (RT-qPCR) ist ein Verfahren zur quantitativen Analyse der Expression spezifischer Gene aus der gewonnenen cDNA. Fluoreszenzfarbstoffe, in dieser Arbeit SYBR Green I, binden an die neu synthetisierte doppelsträngige DNA und ermöglichen durch Messung der Fluoreszenz die Quantifizierung des amplifizierten Produktes in Echtzeit. Die Messungen erfolgten in einem ABI 7500Fast Cycler. Die Genexpression wurde zur Quantifizierung auf konstitutiv exprimierte (*housekeeping*) Gene (Maus: Gapdh, β -Actin; Human: 18S rRNA) bezogen. Ein Reaktionsansatz auf einer RT-qPCR spezifischen 96 well Platte setzte sich wie folgt zusammen:

Ansatz:	2 µl	cDNA
	10 µl	<i>Master-Mix</i> (qPCR Master Mix(2x))
	0,6 µl	Primer (20 µM)
	1 µl	SYBR-Green (1:500)
	ad 20 µl H ₂ O _{bidest}	

Die Reaktionsparameter:

<i>Hotstart:</i>	95°C	10 min	1
	95°C	15 sec	50
	60°C	20 sec	
	72°C	30 sec	
RampRate (3.5 °C/sec)			

Die Expression wurde über den *cycle threshold* (Ct-Wert) quantifiziert, der Zyklus in dem die Fluoreszenz exponentiell ansteigt. Das *housekeeping*-Gen diente hierbei zur Normalisierung. Zur Berechnung der fachen Induktion wurde nachfolgende Formel eingesetzt:

$$\Delta CT = CT (\text{Gen}) - CT (\text{housekeeping-Gen})$$

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT (\text{stimuliert}) - \Delta CT (\text{unstimuliert})$$

$$\text{Fache Änderung: } 2^{-\Delta\Delta CT}$$

2.3.10 RNA-Isolation

Um die RNA vor Degradation durch RNasen zu schützen, wurden Arbeitsplatz und Pipetten mit RNase Away behandelt und Filterspitzen eingesetzt. Die Puffer und Lösungen wurden mit DEPC-H₂O angesetzt. Für eine 6 *well* Platte wurden 1 ml und für eine 96 *well* Platte 100 µl Trizol-Reagent pro *well* eingesetzt und gegebenenfalls gepoolt. Die Zellen wurden in Trizol-Reagent direkt bei -80°C eingefroren bzw. für 5 min bei RT lysiert. Nach Überführung des Lysats in 2 ml Reaktionsgefäße wurden zu 1 ml Trizol 200 µl Chloroform gegeben, gevortext und bei Raumtemperatur 5 min inkubiert. Die Phasentrennung fand unter 15 min Zentrifugation bei 13.000 rpm statt. Die oberer RNA-haltige wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und 1:1 mit Isopropanol gemischt, gevortext und über Nacht bei -20°C gefällt. Die präzipitierte RNA wurde pelletiert (13.000 rpm, 30 min, 4°C), zweimal in 70%igem Ethanol gewaschen und anschließend für 10-30 min bei RT getrocknet. Je nach Größe des Pellet wurde die RNA in entsprechender Mengen DEPC-H₂O gelöst

und bei -80°C gelagert. Erst nach dem Einfrieren wurde die RNA-Konzentration für den weiteren Gebrauch gemessen.

2.3.11 Reverse Transkription in cDNA

Für die cDNA-Synthese wurde die isolierte RNA zunächst mit DNase I behandelt, um eventuell noch vorhandene genomische DNA zu verdauen. Der Reaktionsansatz wurde in PCR-Tubes wie folgt angesetzt:

2 µg	RNA
1 µl	10x Puffer (-MgCl ₂)
0,4 µl	MgCl ₂ (50 mM)
0,5 µl	RiboLock RNase Inhibitor (40 U/µl)
0,5 µl	DNase I (0,5U)
ad 10 µl DEPC-H ₂ O	

Durch Zugabe von 1 µl EDTA (12,5 mM) und einer Inkubation von 15 min bei 65°C wurde die enzymatische Reaktion gestoppt. Nach Hinzufügen von 1 µl Oligo (dT) Primern (0,25 µg/ml pro Ansatz) wurde die RNA durch 10 minütige Inkubation bei 70°C denaturiert, um Sekundärstrukturen zu vermeiden. Alle weiteren Schritte fanden anschließend bei 4°C auf Eis statt. Ein Ansatz zur reversen Transkription setzte sich aus folgenden Komponenten zusammen:

12 µl	DNase I verdauter RNA-Mix
1 µl	10x Puffer (-MgCl ₂)
1 µl	MgCl ₂ (50 mM)
1 µl	dNTPs (10 mM)
2 µl	DTT (0,1 M)
ad 20 µl DEPC-H ₂ O	

2.3.12 Hydrolyse bakterieller RNA

Zum Nachweis pyrophosphorylierter RNA wurde die isolierte RNA sowie eine als Funktionskontrolle fungierende synthetische triphosphorylierte RNA (5`pppRNA, Invivogen) mit der RNA 5' Pyrophosphohydrolase (RppH) oder CIAP (*calf intestinal alkaline phosphatase*) inkubiert. Dabei entfernen die Hydrolasen Pyrophosphate am 5`-Terminus bakterieller RNA. Ein Verdauungsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

2 µl	10x NEB Buffer
1 µl	RppH / CIAP
0,9 / 2,4 µg	RNA
ad 20 µl DEPC-H ₂ O	

Nach einer Inkubationszeit von 30 min bei 37°C im Wasserbad wurde die RNA mit LyoVec komplementiert und nach 20 min auf die Zellen gegeben.

2.4 Proteinbiochemische Methoden

2.5 Gewinnung von Zelllysaten

Zum qualitativen Nachweis von exprimierten und induzierten Proteinen wurden die zu untersuchenden Zellen wie angegeben, ausgesät und stimuliert. Die Zellen wurden anschließend auf Eis mittels PBS (4°C) und eines Zellschabers abgelöst, die Zellsuspension in Falcons überführt und fünf Minuten bei 1200 rpm pelletiert. Nach Resuspension in Lysepuffer wurden die Zellen durch die enthaltenen Detergenzien aufgebrochen (20min auf Eis). Ein weiterer Zentrifugationsschritt (13.000rpm, 4°C) diente der Entfernung der Zelltrümmer und Gewinnung der im Überstand gelösten Proteine. Das Lysat wurde direkt weiterverwendet oder bei -20°C aufbewahrt.

2.6 Analyse der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration ermöglicht die gleichmäßige Beladung eines Gels. Es wurde der Bicinchoninsäure-Assay (BCA, Pierce) als kolorimetrischer

Test angewendet. Dazu wurden die Lysate 1:5 mit Wasser verdünnt und mit 200µl eines Gemisches von Lösung A und B (1:200) komplementiert. Nach einer Inkubationszeit von 30 min bei 37°C wurde mittels Photometer das Absorptionsmaximum bei 562 nm gemessen. Anhand einer BSA Standard-Kurve konnte die Proteinkonzentration in den Proben berechnet werden.

2.7 Eindimensionale Proteinauftrennung

Zur Auftrennung der in Zelllysaten enthaltenen Proteine wurde die diskontinuierliche, eindimensionale SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli genutzt. Anionische Detergenzien wie SDS heben dabei die Sekundärstruktur der Proteine auf, sodass die Eigenladung der Proteine maskiert wird und anionische Komplexe mit einer konstanten Masse entstehen. Dadurch kann eine Auftrennung der Proteine nach Molekulargewicht erfolgen. In dieser Arbeit wurden zum Teil Gradientengele der Firma Biorad (0,5-14%, Criterion Tris-HCL), sowie selbstgegossene Gele (10-12%) genutzt.

Für die selbst hergestellten Gele wurde eine Apparatur der Firma Hoefer verwendet. Die Glas- und Aluminiumplatten, der Kamm für die Auftragstaschen und die *Spacer* (Abstandshalter) wurden gründlich mit 70% Ethanol gereinigt und im Gießstand nach Herstellerangaben eingespannt. Das Trenn- und Sammelgel wurden vorbereitet und die Polymerisation durch Zugabe von TEMED und APS (10%) gestartet. Um Luftblasenbildung zu verhindern, wurde das Trenngel mit Isopropanol überschichtet. Das Sammelgel wurde nach Polymerisation des Trenngels aufgeschichtet und der Kamm für die Auftragstaschen eingesetzt. Fertige Gele konnten direkt genutzt oder in feuchte Tücher geschlagen bei 4°C bis zu einer Woche aufbewahrt werden.

Die zu untersuchenden Lysate wurden nach Berechnung der aufzutragenden Menge mit dem entsprechenden Volumen an 5x SDS-Auftragspuffer komplementiert und die Proteine bei 95°C für 5 min denaturiert. Zur Identifikation der Proteingrößen wurde ein Protein-Größenstandard (*PageRuler prestained protein ladder*, Thermo Scientific) aufgetragen. Um die gleichmäßige Auftrennung zu gewährleisten, wurden die Proteine zunächst bei 80 V (1000 mA, 150 W) ins Trenngel einlaufen gelassen

und anschließend bei 120 V aufgetrennt. Zur Auftrennung in den kommerziellen Gelen wurden 200 V vom Hersteller empfohlen.

2.8 Western Blot Analyse

Mittels Bindung eines spezifischen Antikörpers (Immuno-Blot) wurden die aufgetrennten Proteine analysiert. Dazu wurde das Trenngel nach der elektrophoretischen Auftrennung auf eine Nitrozellulose-Membran überführt und mit je vier Lagen Whatman Filterpapier bedeckt. Das Ganze wurde Luftblasen-frei und semi-feucht in die Blotkammer (Biorad) eingespannt. Die Proteine wurden bei 14-25 V für 30-45 min vom Gel auf die Nitrozellulose transferiert. Anschließend konnten die transferierten Proteine zur Kontrolle mittels Ponceau, einem roten Azofarbstoff, angefärbt und sichtbar gemacht werden. Um unspezifische Antikörper-Bindung an die Membran zu verhindern, wurde der Blot für 1 h bei RT in *Blocking*-Puffer geschwenkt. Die Inkubation der Membran mit dem spezifischen Primärantikörper erfolgte über Nacht bei 4°C in einem rotierenden 50ml Falcon. Nach dem Waschen (3x 10 min) in PBT, wurde der Blot für 1 h mit dem Sekundärantikörper inkubiert. Die Detektion fand nach fünf erneuten Waschschritten in einem Fusion FX7 statt. Zur Anregung der Chemilumineszenz durch die am Sekundärantikörper gekoppelte Meerrettich-Peroxidase (horse radish peroxidase, HRP) wurde der Blot mit dem Substrat ECL (*enhanced chemiluminescence*, Perkin Elmer) beschichtet und nach 1 min bei RT analysiert.

2.9 Statistische Auswertung

Für die Abbildungen wurden der Mittelwert und die Standardabweichung (SD, *standard deviation*) von Triplets berechnet. Jeweils eins von mindestens drei unabhängigen Experimenten ist dargestellt. Mittels Excel wurde durch den sogenannten T-Test (student's t-test, unpaired) die Signifikanz zwei zu vergleichender Proben berechnet. Die Signifikanz der Unterschiede wurde mit <0,05 (signifikant) und **p<0,01 (hochsignifikant) gekennzeichnet.

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung der Funktion endosomaler TLRs in der Erkennung von Gram-positiver Bakterien

Die Wirtserkennung Gram-negativer Bakterien wird von TLR2 und TLR4 dominiert (Spiller et al. 2008). Dies trifft nicht auf die Erkennung Gram-positiver Bakterien zu. Selbst primäre Makrophagen von Mäusen, die defizient für TLR2, -3, -4, -7 und -9 sind, reagieren normal auf Gram-positive Bakterien wie z. B. *S. aureus* (Ferstl 2009, Dissertation). Doch weder C-Typ Lectine noch zytoplasmatische PRRs sondern TLR/IL-1 Rezeptoren implizierten wir als Kandidaten, wobei einzelsträngige RNA als verursachendes PAMP identifiziert wurde (Oldenburg et al. 2012). Es war das Ziel des ersten Teils dieser Arbeit, den gesuchten Rezeptor sowie das stimulative Motiv der Gram-positiv bakteriellen RNA zu identifizieren. Zahlreiche DNA oder RNA erkennende PRR sind im Cytoplasma und im Falle von TLRs im Endolysosom lokalisiert. Deshalb untersuchte ich Mäuse, die defizient für das Chaperon Unc93B1 (3D) sind und mit *Tlr2^{-/-}* gekreuzt wurden, weil TLR2 der bis dato bekannte Hauptrezeptor für Gram-positive Bakterien war. Unc93B1 ist ein 12-fach die Zellmembran durchziehendes Chaperon, das alle endosomalen TLRs vom endoplasmatischen Retikulum (ER) ins Endosom rekrutiert. Deren Knochenmarkszellen wurden wie beschrieben ausdifferenziert und mit verschiedenen Mengen hitzeinaktivierter Bakterien für 16 h inkubiert. Der Überstand wurde anschließend auf seinen Zytokingehalt per ELISA untersucht. Wildtyp (wt) Makrophagen reagierten dosisabhängig sowohl auf Gram-positive Bakterien wie z. B. *B. subtilis* und *S. aureus* als auch auf Gram-negative Bakterien (*E. coli*), während *3D/Tlr2/4^{-/-}* darauf nicht reagierten bzw. kein IL-6 produzierten (Abbildung 5). Gram-negative Bakterien stimulierten in den *3D/Tlr2^{-/-}* Makrophagen TLR4 und aktivierten somit die Zytokinproduktion ähnlich wie in wt Zellen. Als Kontrollstimuli wurden Lipopeptid (Pam₃CSK₄, TLR2), LPS (TLR4), R848 (TLR7) und 1668 (TLR9) appliziert.

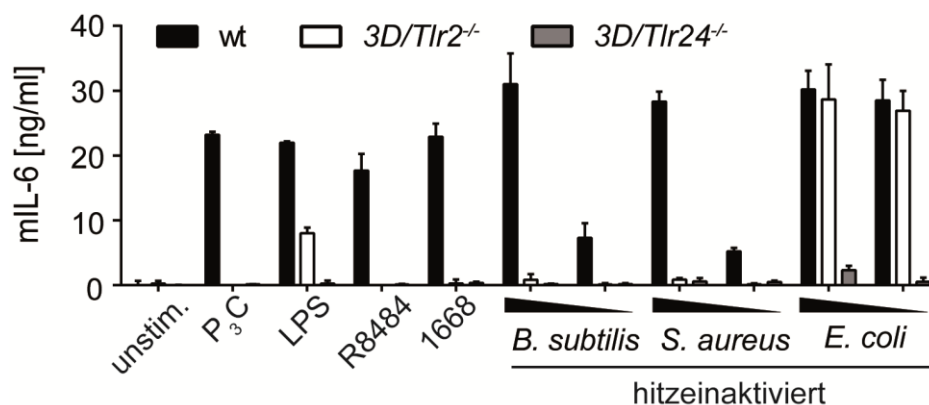


Abbildung 5: Erkennung Gram-positiver Bakterien durch endosomale TLRs. Maus Makrophagen von wt, 3D/Tlr2^{-/-} und 3D/Tlr24^{-/-} Mäusen wurden mit 1 µg/ml P₃C (Pam₃CSK₄), 0,1 µg/ml LPS, 0,2 µg/ml R848, 10 µM 1668 sowie hitzeinaktivierte Bakterien (10⁸ cfu/ml) konfrontiert und der Überstand nach 16 auf seinen Zytokingehalt hin untersucht.

Um eine Interferenz nicht endosomaler und bekannter Nukleinsäure-erkennender TLRs auszuschließen, wurden Tlr23479^{-/-} Makrophagen mit einer Suspension hitzeinaktivierten *S. aureus* (hiSa) Bakterien, die mit oder ohne einzelsträngige-RNA-verdauender RNase A behandelt worden war, konfrontiert. Während unbehandelter hiSa dosisabhängig mL-6 induzierte, führte die Behandlung mit RNase A zur Abwesenheit einer Stimulation (Abbildung 6 A). Der aktivierende Effekt der ssRNA wurde ebenfalls über die Messung der NO-Produktion deutlich (Abbildung 6 B).

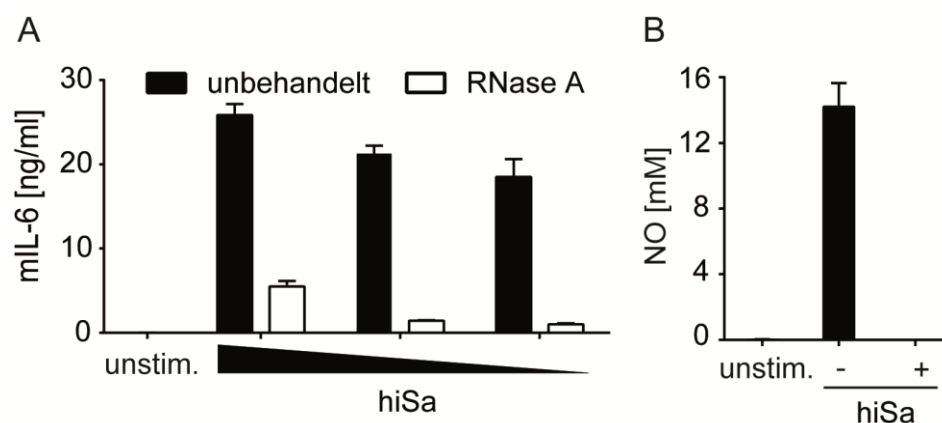


Abbildung 6: Bakterielle RNA als Ligand endosomaler TLRs. Tlr23479^{-/-} Makrophagen wurden mit 10⁹, 10⁸ und 10⁷ cfu/ml hitzeinaktiviertem *S. aureus* (hiSa) stimuliert, der mit (+) und ohne (-) RNase A behandelt wurde. Der mL-6 (A) sowie (B) Stickstoffmonoxid (NO) Gehalt im Überstand wurde nach 16 h Inkubation bestimmt.

3.1.1 Rolle der TLR -11, -12 und -13 in der Erkennung von bakterieller RNA

Nach Identifizierung der ssRNA als stimulative Aktivität suchten wir nach dem bislang unbekannten endosomalen TLR, der eine Erkennung der Gram-positiven Bakterien vermittelt. Die Responsivität der *Tlr23479*^{-/-} Makrophagen auf hiSa schloss ja die TLR -3, -7 und -9 als Vermittler dieser Aktivierung aus. Weitere Kandidaten waren somit TLR8, -11, -12 und -13, wobei die letzten drei bis zu diesem Zeitpunkt als Waisen (*orphan*) Rezeptoren und TLR8 in der Maus als weitgehend inaktiv galten (Pifer et al. 2011, Oldenburg et al. 2012, Koblansky et al. 2013, Lee et al. 2013). In HEK293 Zellen wurden Plasmide zur Expression von TLR11, -12 und -13 allein und in Kombination zusammen mit einem NFκB getriebenen Luziferase-Promotor sowie einem Renilla Plasmid als interne Kontrolle transfiziert. 24 h später wurden die Zellen für weitere 16 h mit LPS, hitzeinaktivierten *E. coli* (hiEc) und *S. aureus* (hiSa) inkubiert. Die Zelllysate wurden dann auf Luziferase- und Renilla-Aktivität per Luminometermessung untersucht. Weder Gram-positive Bakterien noch LPS aktivierten die Zellen. Hingegen induzierte hiEc eine substantielle Aktivierung von TLR11, TLR12 und TLR11/12 überexprimierenden Zellen, was diese Rezeptoren als ssRNA Sensoren Gram-positiver Bakterien ausschloss (Abbildung 7).

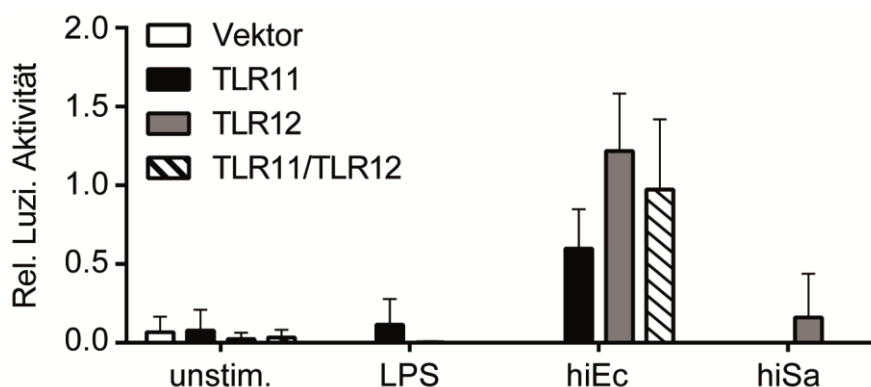


Abbildung 7: TLR11 und 12 werden nicht durch Gram-positive Bakterien aktiviert. HEK293 Zellen wurden mit TLR 11 und TLR 12 (5 ng) und einer Kombination aus Plasmiden zur Expression der beiden TLRs sowie einem 6xNFκB Reporterkonstrukt transfiziert. Nach 16 h wurden die Zellen unstimuliert (unstim.) belassen oder mit 0,1 µg/ml LPS, 10⁷ cfu/ml *E. coli* und *S. aureus* inkubiert, um das Zelllysate auf seine relative Luziferaseaktivität (Rel. Luzi. Aktivität) hin zu analysieren.

Im Jahr 2005 wurde das 17,5 kDa große Profilin-ähnliche Protein von *Toxoplasma gondii* als TLR11 Ligand identifiziert (Yarovinsky et al. 2005). Es wurde postuliert, dass TLR11 und -12 in Makrophagen und konventionellen dendritischen Zellen (cDCs) co-operativ Profilin erkennen, während TLR12 in plasmazytoiden DCs (pDCs) für eine Immunantwort ausreichend ist (Andrade et al. 2013, Koblansky et al. 2013). Profilin ist ein in Toxoplasmen vorkommendes Protein, dass zu den Aktin bindenden Proteinen (ABPs, *actin binding proteins*) zählt und essentiell für die bakterielle Aktin-abhängige Motilität und Zellinvasion ist (Theriot et al. 1994, Plattner et al. 2008).

Also untersuchten wir die Aktivierung von TLR11 und -12 überexprimierenden HEK293 Zellen durch Profilin. Der Überstand von Profilin produzierenden HeLa Zellen sowie ihr Lysat wurden per Luciferase-Assay mittels NF κ B-Promotorkonstrukt auf ihre stimulative Wirkung hin untersucht. Der Überstand sowie das Lysat von un-behandelten HeLa Zellen diente als Negativkontrolle (Mock). Der Profilin-haltige Überstand aktivierte die Kombination von TLR11 und -12, nicht jedoch die einzeln transfizierten TLRs (Abbildung 8). Das Lysat hingegen aktivierte sowohl untransfizierte Zellen und in einem größeren Maß TLR11 und -12 in Kombination. Diese Befunde erhärteten die bereits von anderen publizierten Daten, dass Profilin TLR11 zusammen mit -12 aktiviert (Koblansky et al. 2013, Raetz et al. 2013).

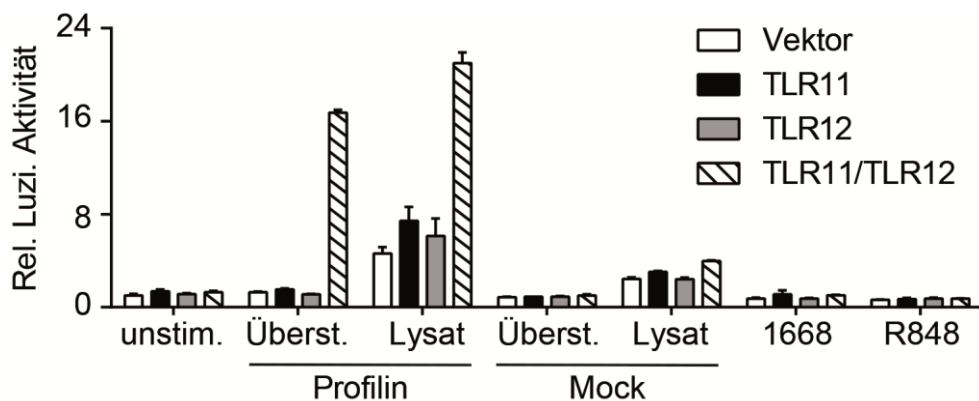


Abbildung 8: Profilin aktiviert TLR11 und TLR12. TLR11, TLR12 und TLR11/12 überexprimierende HEK293 Zellen wurde mit dem Überstand (Überst.) und dem Lysat von Profilin exprimierenden und parentalen (Mock) Hela Zellen sowie 1668 (10 μ M) und R848 (2 μ g/ml) inkubiert. Das Lysat wurde anschließend auf die NF κ B-Promotorkonstrukt induzierte Luziferaseaktivität (Rel. Luzi. Aktivität) untersucht.

Daraufhin wandte ich mich TLR13 zu und überexprimierte ihn in HEK293 Zellen. Diese konfrontierte ich mit dem Gram-negativen Bakterium *Bacteroides fragilis* und dem Gram-positiven Bakterium *S. aureus*. TLR13 induzierte dosisabhängig eine Luziferaseaktivität nach Inkubation mit hitzeinaktivierten *S. aureus*, wohingegen *B. fragilis* keine Induktion auslöste (Abbildung 9). Diese Ergebnisse identifizierten TLR13 als den gesuchten Sensor von Gram-positiven Bakterien.

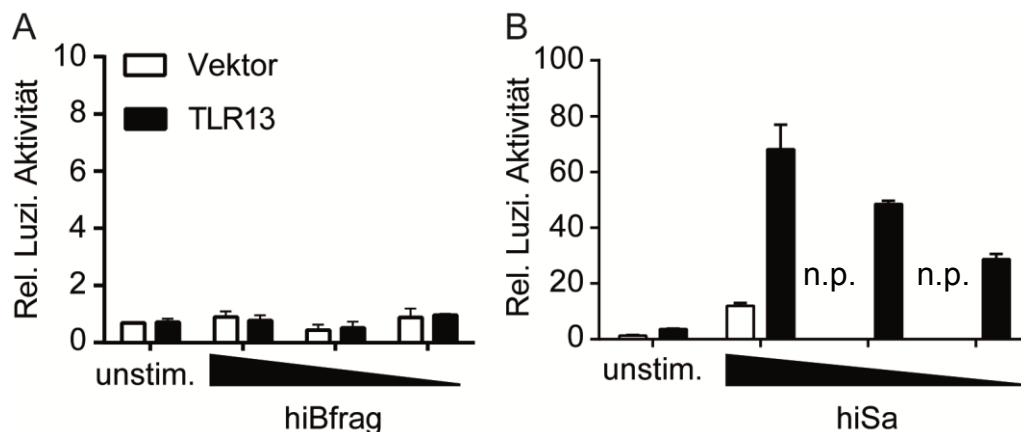


Abbildung 9: Gram-positive aber nicht Gram-negative Bakterien aktivieren TLR13. 15 ng eines Plasmids zur Expression des Rezeptors TLR13 wurden zusammen mit einem NF κ B Reporterkonstrukt in HEK293 Zellen überexprimiert. Anschließend wurden die Zellen unstimuliert (unstim.) belassen oder mit hitzeinaktivierten (hi) *B. fragilis* (Bfrag) und *S. aureus* (Sa) in den Dosen 10⁸, 10⁷ und 10⁶ cfu/ml konfrontiert, um die Zell-Aktivierung via Luziferase-Assay zu messen (np.: not performed).

3.1.2 Identifizierung eines spezifischen 23S rRNA Segments als TLR13-aktivierendes Motiv

3.1.2.1 Identifizierung der 23S rRNA als stimulierende Fraktion

Nachdem wir Gram-positive bakterielle ssRNA als starken und TLR2, -3, -4, -7 und -9 unabhängigen aber TLR abhängigen Entzündungsreaktionsauslöser sowie TLR13 als Sensor Gram-positiver Bakterien impliziert hatten, wurde die Total-RNA isoliert und auf TLR13 exprimierende HEK293 Zellen appliziert. Die geringste Konzentration der transfizierten Total-RNA induzierte die höchste Luziferaseaktivität

(Abbildung 10 A). Auch die RNA von *S. pyogenes* aktivierte TLR 13, während die Vektorkontroll-Proben keine Aktivierung aufwiesen (Abbildung 10 B).

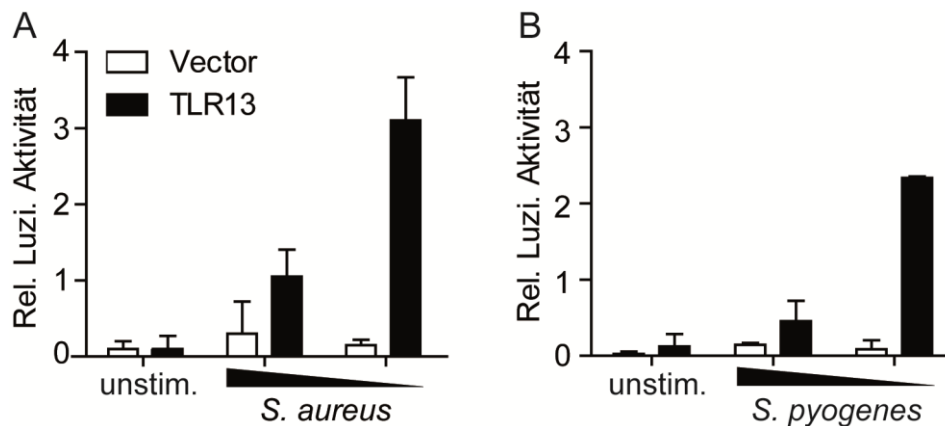


Abbildung 10: Aktivierung von TLR13 durch Gram-positiv bakterielle RNA. Der Leervektor (Vektor) und TLR13 (15 ng) Expressionsvektor wurden zusammen mit dem NF κ B getriebenen Promotorkonstrukt transfiziert. 1 μ g oder 0,2 μ g der Total-RNA von (A) *S. aureus* und (B) *S. pyogenes* wurden mit LyoVec transfiziert und 16 h nach Inkubation die Luciferaseaktivität (Rel. Luzi. Aktivität) gemessen.

Mit dem Ziel der Einengung des aktivierenden Motivs wurde die RNA von *S. aureus* in eine hochmolekulare (hmw) und die niedermolekulare (lmw) Fraktion per HPLC (durch die Arbeitsgruppe von Stefan Bauer (Marburg) und weitergehend die hmw rRNA in 23S und 16S Fraktionen von Anne Krüger aufgetrennt (Oldenburg et al. 2012). Die hmw Fraktion repräsentiert die 23S und die 16S rRNA und die lmw Fraktion die 5S und tRNA (Abbildung 11). Die ribosomale RNA von Bakterien umfasst drei Subpopulationen, namentlich 23S, 16S und 5S rRNA, während jene von Eukaryoten vier Subpopulationen beinhaltet, 28S, 18S, 5.8S und 5S rRNA. Die 23S ist zusammen mit der 5S rRNA in der großen und die 16S rRNA in der kleinen Untereinheit des Ribosoms lokalisiert. Während bei Eukaryoten die 28S, 5,8S und 5S rRNA die große und die 18S die kleine Untereinheit repräsentiert.

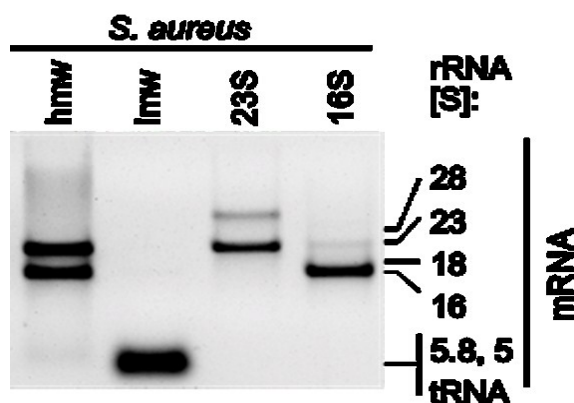


Abbildung 11: Auftrennung der Total-RNA von *S. aureus* in seine Fraktionen. Die Total-RNA von *S. aureus* wurde mittels HPLC in hochmolekulare (hmw) und niedermolekulare (lmw) RNA aufgetrennt. Die 23S und die 16S rRNA Fraktionen wurden über ein 1%iges Agarosegel angereichert.

Zunächst transfizierte ich wt, *Tlr23479*^{-/-} und *3D/Tlr2*^{-/-} Makrophagen mit der Gram-positiv bakteriellen Total-RNA, der hmw und der lmw Fraktion der RNA von *S. aureus*. Die niedermolekulare RNA stimulierte weder die wt noch die *knock-out* Makrophagen, während die Total-RNA und die hochmolekulare Fraktion der RNA wt und in einem höherem Maß die *Tlr23479*^{-/-} Makrophagen aktivierte (Abbildung 12). *3D/Tlr2*^{-/-} Makrophagen hingegen waren unresponsiv für jegliche RNA Fraktion. Gleichwohl reagierten sie auf eine Konfrontation mit LPS, was einen endosomalen TLR als hmw *S.aureus* rRNA Sensor implizierte.

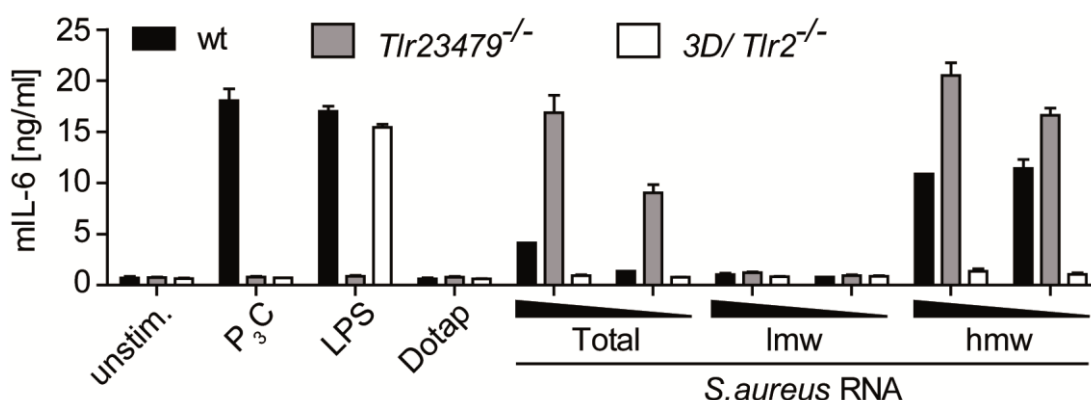


Abbildung 12: Die Total-RNA sowie die hmw-Fraktion von *S. aureus* induziert mL-6. Wt, *Tlr23479*^{-/-} und *3D/Tlr2*^{-/-} Makrophagen wurden über Nacht mit 10 µg/ml P₃C (Pam₃CSK₄) und 0,1 µg/ml LPS stimuliert. Die 2 µg Total-RNA, und jeweils 0,2 sowie 2 µg der

niedermolekulare (lmw) und hochmolekulare (hmw) Fraktion von *S. aureus* wurden mit Dotap transfiziert. Die mIL-6 Konzentrationen wurden via ELISA analysiert.

Im nächsten Schritt untersuchte ich die 23S und die 16S rRNA aus der hmw Fraktion. Während die 16S rRNA die *Tlr23479*^{-/-} Zellen nicht stimulierte, induzierte die Total-RNA sowie die 23S rRNA eine Induktion der Produktion von IL-6, was die 23S rRNA als stimulative RNA impliziert (Abbildung 13).

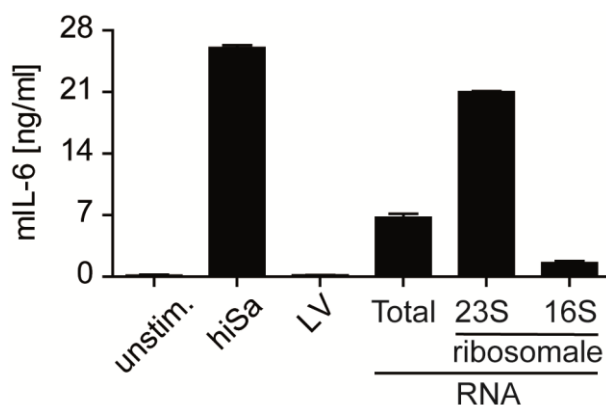


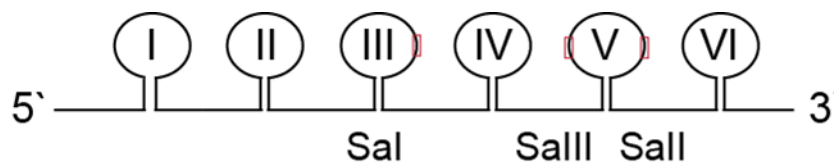
Abbildung 13: Die 23S aber nicht die 16S rRNA aktivierte *Tlr23479*^{-/-} Makrophagen. *Tlr23479*^{-/-} Knochenmarkszellen wurden mit 10⁸ cfu/ml hitzeinaktivierter *S. aureus* (hiSa) Suspension konfrontiert. Die Total- sowie die 23S und 16S ribosomale RNA wurden mit LyoVec (LV) transfiziert und der Überstand per ELISA untersucht.

3.1.2.2 Rolle der MLS Resistenz vermittelnden Methylierung in der Erkennung der 23S rRNA durch TLR13

Die 23S rRNA ist durch ihr hochkonserviertes Vorkommen als immunstimulatorisches PAMP qualifiziert. Bakterien evolvierten verschiedene Mechanismen, um sich in verschiedenen Lebensräumen zu etablieren. Mechanismen sind z. B. Mutationen und Modifikationen der ribosomalen RNA wie z. B. Methylierungen und Phosphorylierungen (Kariko und Weissman 2007). Diese Modifikationen ermöglichen es den Bakterien, z. B. Resistenzen gegen Antibiotika zu entwickeln. Die bakterielle 23S rRNA hat eine Größe von 3 kb und katalysiert zusammen mit der 16S rRNA und ribosomalen Proteinen als Ribozym die Proteinbiosynthese in allen Lebewesen. Wir hypothesisierten, dass diejenigen Regionen, die zur Modulierung der Ribosomaktivität besonders hoch konserviert und deshalb gute

Kandidaten für immunstimulierende PAMP sind. Auf der Suche nach diesen hochkonservierten Regionen in der 23S rRNA der Bakterien stießen wir auf solche, die durch Methyltransferasen methyliert werden, um die Bakterien gegen Antibiotika resistent zu machen oder den diätischen Bedingungen anzupassen.

Wir kreierten drei Oligoribonukleotide: Sal, Sall und SalII. Während Sal in Domäne III von *E. coli* und *S. aureus* lokalisiert ist, liegen Sall und –III nahe dem katalytischen Zentrum des Ribosoms in Domäne V (Abbildung 14). Sal wird am Adenosin (A) 1662 in *S. aureus* und A1616 in *E. coli* methyliert, was zu einer Antibiotikaresistenz führt und die Fitness der Bakterien erhöht (Sergiev et al. 2008). Sall repräsentiert das katalytische Zentrum (PTL-Loop) in dem das Adenosin 2530 lokalisiert ist (*E. coli*, Adenosin 2503), das durch die Methylierung eine Resistenz gegen Antibiotika wie Chloramphenicol, Clindamycin oder Tiamulin vermittelt (Kehrenberg et al. 2005, Toh et al. 2008, Kaminska et al. 2010, LaMarre et al. 2011). SalII birgt die 23S rRNA Sequenz um das Adenosin 2058. Diese ebenfalls wie Sall in Domäne V der 23S rRNA liegende Sequenz vermittelt in durch Mutation oder Methylierung veränderter Form eine Resistenz gegenüber Makrolid, Lincosamid und Streptogramin B (MLS) Antibiotika (Vester und Douthwaite 1994, Kovalic et al. 1995, Pfister et al. 2005).



Sal: CCGACACAGGUAGUCAAGAU

Sall: GCACCUCGAψGUCGC

SalII: GGUUACCCGCGACAGGACGGAAGACCCCGUGGAGCUUUACUGUAGCC

Abbildung 14: Schema der 23S rRNA und der sechs Domänen. Sequenzen der ORNs Sal, Sall und SalII aus den Domänen III und V (rot markiert), die durch Methylierung Resistenz vermitteln. Das aktive Zentrum des Ribosoms ist in Domäne V lokalisiert.

Wildtyp, *Tlr23479*^{-/-} und *3D/Tlr2/4*^{-/-} Makrophagen wurden mit den synthetischen Oligoribonukleotiden (ORN) Sal, Sall und SalII transfiziert. Sal und Sall lösten weder in *knock-out* noch in wt Makrophagen eine Mediatorproduktion aus. SalII hingegen induzierte eine erhöhte NO-Produktion in wt und signifikant stärker in *Tlr23479*^{-/-}

Makrophagen, wohingegen *3D/Tlr2/4^{-/-}* Makrophagen nicht responsiv waren (Abbildung 15).

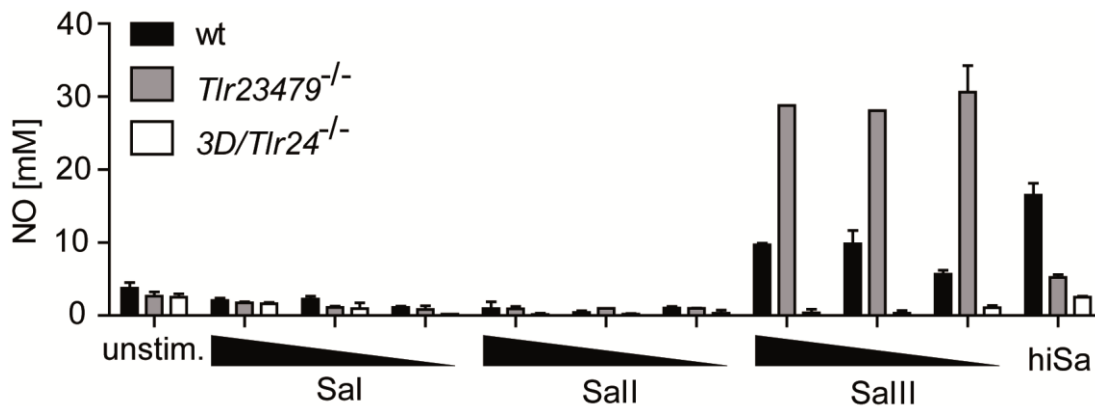


Abbildung 15: Salll stimuliert wt und *Tlr23479^{-/-}* Makrophagen. Wt und *Tlr23479^{-/-}* sowie *3D/TLR24^{-/-}* Makrophagen wurden mit 1, 10 und 100 pmol der ORN Sal, Sall und Salll (Dotap) transfiziert. Als Kontrolle wurde 10^8 cfu/ml hitzeinaktivierter *S. aureus* (hiSa) appliziert.

Dieser Befund implizierte Salll, dessen Kernmotiv in allen medizinisch relevanten Bakterien konserviert (identisch) ist, als dasjenige immunstimulatorische PAMP, das von TLR13 erkannt wird.

3.1.3 Untersuchung der 23S rRNA Maskierung durch Methyltransferasen

3.1.3.1 Untersuchung von klinischen MRSA-Isolate auf ihr TLR13 aktivierendes Potential

1953 wurde zum ersten Mal Methicillin-resistenter *S. aureus* (MRSA) beschrieben und ausgehend davon wurde die Adenin-spezifische N-Methyltransferase (erm) entdeckt, die die 23S rRNA durch Methylierung z. B. am A2058/85 (Sa/Ec) modifiziert (Abbildung 16) (Eady et al. 1993, Weisblum 1995).

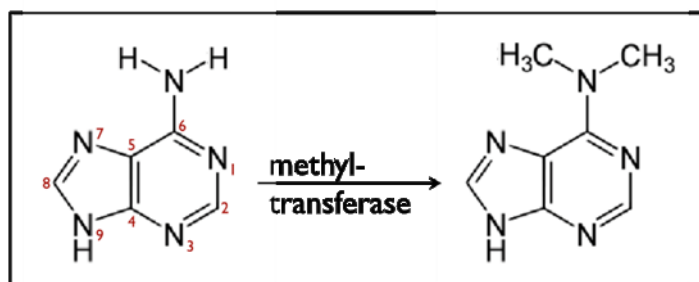


Abbildung 16: Die Erythromycin-Resistenz assoziierten Methyltransferasen katalysierten die Methylierung eines spezifischen Adenosins. Das Enzym ermC transferiert Methylgruppen (CH_3) auf das Atom N6 der Adenosin Base im aktiven Zentrum des Ribosoms.

Um das Konzept einer Methyltransferase vermittelten Methylierung als Maskierung des SaIII-rRNA Segments gegenüber einem endosomalen TLR zu validieren, untersuchten wir fünf klinische MRSA Isolate. MRSA und Kontroll-Bakterien wurden in Erythromycin-haltigem oder -losem Medium angezüchtet, hitze-inaktiviert und auf ihr Makrophagen-Aktivierungspotential hin untersucht. Erythromycin induziert die Expression der Methyltransferasen von MRSA, um die Methylierung der 23S rRNA zu vermitteln. Während nicht-resistente hiSa in *Tlr23479*^{-/-} Makrophagen die IL-6 Produktion aktivierten, beobachteten wir, dass die Zellen, konfrontiert mit den MRSA-Isolaten, kultiviert in Erythromycin-haltigem Medium, keine proinflammatorischen Zytokinen induzierten (Abbildung 17 A). Konsequenterweise isolierten wir aus MRSA die Total-RNA sowie die große 23S und die kleine 16S rRNA. Total- und 23S rRNA von MRSA, der in Erythromycin (Ery) kultiviert worden war, wurde von *Tlr23479*^{-/-} Makrophagen kaum erkannt, während 23S rRNA aus demselben MRSA Isolat auf Kultivierung in Erythromycin-freiem Medium *Tlr23479*^{-/-} Makrophagen umfänglich aktivierte (Abbildung 17 B).

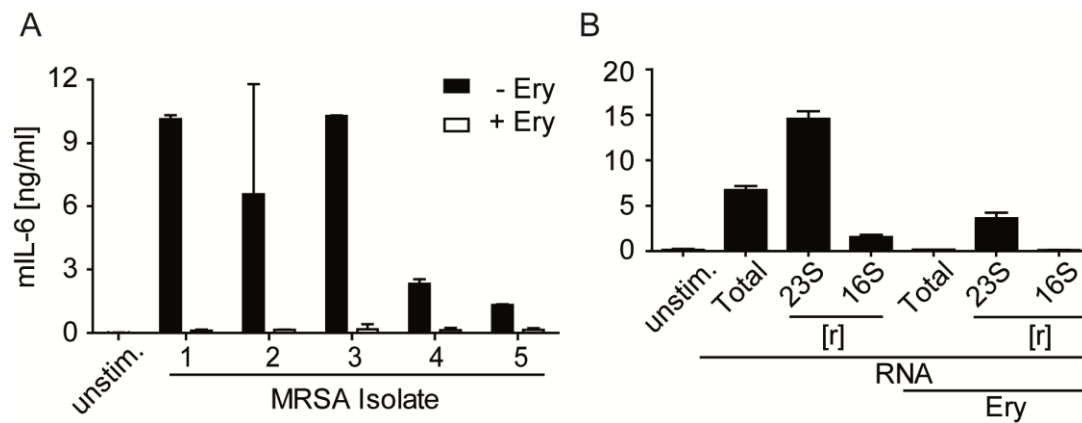


Abbildung 17: Kultivierung von MRSA in Erythromycin hebt stimulativen Effekt auf. (A) *Tlr23479^{-/-}* Makrophagen wurden mit hitzeinaktivierten klinischen MRSA Isolaten (1-5), die mit und ohne Erythromycin (Ery) kultiviert worden waren, konfrontiert. (B) Aus dem mit und ohne Erythromycin (Ery) kultiviertem klinischen Isolat 1 wurde die Total-, und die ribosomalen (r) RNAs isoliert und je 1 µg mit Dotap in die Zellen transfiziert. Nach 16 h wurde der Überstand via ELISA auf die enthaltene mIL-6 Menge hin untersucht.

3.1.3.2 Überexpression von *ermB* und *ermC* in Gram-negativen und Gram-positiven Bakterien maskiert deren RNA vor TLR13

Um die Involvement der Methyltransferaseaktivität in die Maskierung der 23S rRNA für das Immunsystem zu verdeutlichen, isolierten wir die cds der Methyltransferase *ermC* aus einem der MRSA Isolate. Wir präparierten die Total-RNA, die in cDNA umgeschrieben wurde. Nach Erstellung der Primer wurde per Real-Time PCR *ermC* cDNA amplifiziert und über ein Agarosegel isoliert sowie per Sequenzierung kontrolliert (Abbildung 18). Die cDNA wurde von uns in den Klonierungsvektor pjet1.2 ligiert. Nach Ligation in den Expressionsvektor pGEX2T (durch H. Hochrein) wurde *E. coli* (Gram-negativ) mit den *ermC* codierenden Plasmid transformiert.

S.aureus ermC HG380317.1	MNEKNIKHSQ	NFITSKHNID	KIMTNIRLNE	HDNIFEIGSG	KGHFTLELVQ	50
ermC Probe3	MNEKNIKHSQ	NFITSKHNID	KIMTNIRLNE	HDNIFEIGSG	KGHFTLELVQ	50
S.aureus ermC HG380317.1	RCNFVTAIEI	DHKLCKTTEN	KLVDHDNFQV	LNKDILQFKF	PKNQSYKIFG	100
ermC Probe3	RCNFVTAIEI	DHKLCKTTEN	KLVDHDNFQV	LNKDILQFKF	PKNQSYKIFG	100
S.aureus ermC HG380317.1	NIPYNISTDI	IRKIVFDSIA	DEIYLIVEYG	FAKRLNTKR	SLALFLMAEV	150
ermC Probe3	NIPYNISTDI	IRKIVFDSIA	DEIYLIVEYG	FAKRLNTKR	SLALFLMAEV	150
S.aureus ermC HG380317.1	DISILSMVPR	EYFHPKPKVN	SSLIRLNRKK	SRISHKDKQK	YNYFVMKWVN	200
ermC Probe3	DISILSMVPR	EYFHPKPKVN	SSLIRLNRKK	SRISHKDKQK	YNYFVMKWVN	200
S.aureus ermC HG380317.1	KEYKKIFTKN	QFNNSLKHAG	IDDLNNISFE	QFLSLFNSYK	LFNK* - - - -	245
ermC Probe3	KEYKKIFTKN	QFNNSLKHAG	IDDLNNISFE	QFLSLFNSYK	LFNK* IFLED	250

Abbildung 18: Proteinsequenz der Methyltransferase ermC. Per RT-PCR wurde die ermC cDNA aus RNA eines klinischen MRSA Isolats (ermC Probe3) umgeschrieben und durch Alignment mit der ermC Sequenz (Hg380317.1) abgeglichen.

Nach Kultivierung in Erythromycin-haltigem Medium isolierten wir die jeweiligen 23S und 16S rRNAs. *TLR23479*^{-/-} Makrophagen wurden mit total RNA als Positivkontrolle sowie den isolierten RNA Fraktionen transfiziert und ihre Zytokinproduktion per ELISA untersucht. Es stimuliert lediglich die 23S rRNA von parentalem *E. coli* und nicht die 16S rRNA. Die Überexpression von ermB und ermC tragenden Plasmiden verminderte den stimulativen Effekt umfänglich (Abbildung 19).

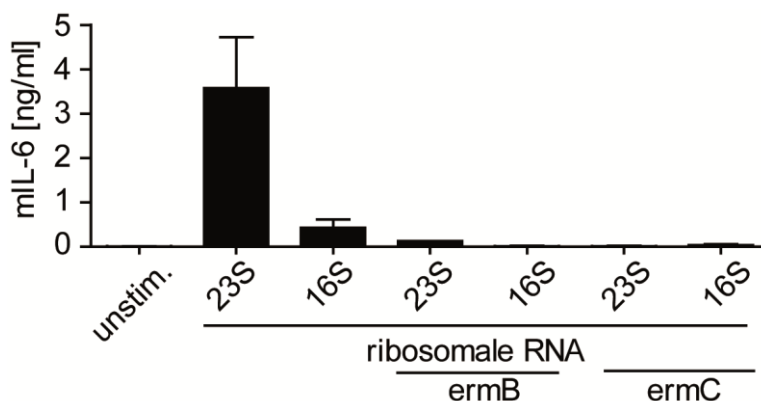


Abbildung 19: Die Überexpression von Methyltransferasen in *E. coli* hebt den stimulativen Effekt der 23S rRNA auf. Die RNA von ermB und ermC überexprimierenden *E. coli* sowie die des parentalen *E. coli* Stammes wurde isoliert und fraktioniert. *Tlr23479*^{-/-} Makrophagen wurden mit jeweils 1 µg der 23S und 16S rRNA transfiziert. 16 h nach Inkubation wurde der Überstand via ELISA analysiert.

3.1.4 TLR13 ist der Rezeptor des 23S rRNA Segments „Sa19“

Die MyD88 Abhängigkeit in der Erkennung Gram-positiver Bakterien wies auf eine TLR-Involvierung hin. Die fehlende Produktion proinflammatorischer Zytokine von Unc93B1 defekten (3D) Makrophagen nach Stimulation mit Gram-positiv bakterieller Total- und 23S rRNA implizierte einen endosomalen TLR als den gesuchten Rezeptor. Ich hatte zuvor (Abbildung 9) TLR13 als *S. aureus* RNA Sensor impliziert. Als nächstes untersuchte ich SaIII bzw. ein größenmäßig auf hochkonservierte Kern-region reduziertes ORN, namentlich Sa19 (Tabelle 15). Seine TLR7, -8, -9 und -13 aktivierende Kapazität wurde überprüft, um beide Befunde, namentlich „TLR13 aktiviert durch bakterielle 23S rRNA“ und „*Tlr23479*^{-/-} Makrophagen aktiviert durch SaIII“, in Übereinstimmung zu bringen.

In HEK293 Zellen wurde TLR13 sowie zur Kontrolle TLR7, -8 und -9 als Vertreter von endosomal lokalisierten ss-Nukleinsäure-erkennenden TLR überexprimiert. Die Zellen wurden mit dem jeweilig spezifischen TLR Liganden (Positivkontrolle) sowie dem synthetischen ORN Sa19 inkubiert bzw. transfiziert. Während die Verwendung von Positivkontrollen effektiv war, reagierten Zellen mit überexprimierten TLR außer TLR13 nicht auf Sa19 (Abbildung 20). SaIII und Sa19 aktivierten ausschließlich TLR13 überexprimierende HEK293 Zellen sowohl Rezeptor- als auch Linganddosisisabhängigkeit (Abbildung 20 B).

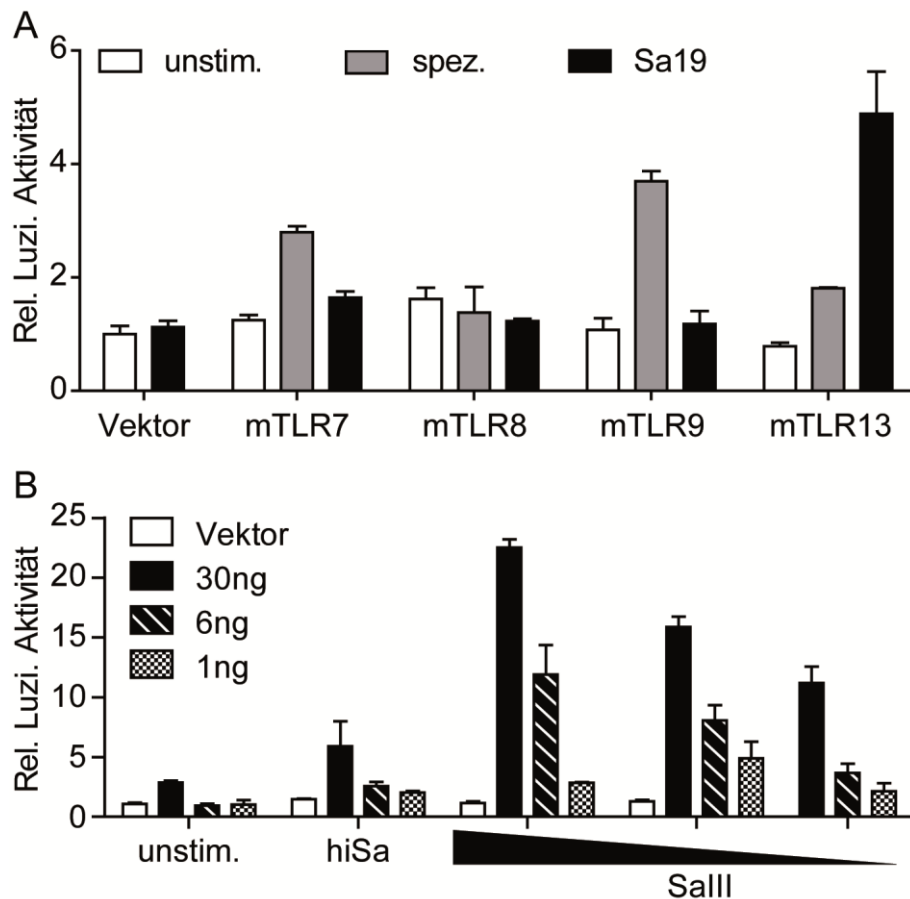


Abbildung 20: SaIII und Sa19 werden spezifisch über TLR13 erkannt. (A) HEK293 Zellen wurden mit murinen TLR7, -8, -9 und -13 kodierenden Plasmiden transfiziert. Die Zellen wurden nicht (unstim.) oder mit dem TLR spezifischen Liganden (spez.; TLR7: 2 µg/ml R848, TLR8: 2,5 µg/ml CL075 und TLR9: 10 µM 1668) sowie 1 pmol Sa19 in 200 µl inkubiert. (B) Das TLR13 Plasmid wurde in drei verschiedenen Dosen in HEK293 Zellen transfiziert und mit 10^8 cfu/ml hitzeinaktivierten *S. aureus* (hiSa) oder 100, 10 und 1 pmol SaIII konfrontiert. Die NFκB getriebene Luziferaseaktivität (Rel. Luzi. Aktivität) wurden nach 16 h analysiert.

Per ENU-Mutagenese (*point mutations induced by N-ethyl-N-nitrosourea*) und nachfolgenden immunologischen Screening von Mäusen wurde eine nicht näher charakterisierte Punktmutation in TLR13 identifiziert ((Berger M et al. 2010). Diese Punktmutation (A2054G) führt zu einem Austausch der Asparaginsäure durch ein Glycin in der sechsten LRR Region (*leucine rich region*). Diese Mutation führte ich über eine Mutagenese-PCR in das wt TLR13 Expressionsplasmid ein. Als Kontrolle diente neben der Sequenzierung ein Restriktionsverdau. Während HaeIII die Mutante und den wt verdaute, konnte Avall (GGWCC) lediglich die mutierte Form des TLR13 schneiden (Abbildung 21).



Abbildung 21: Parentale und mutierte TLR13 Sequenz werden durch Restriktionsenzyme unterschiedlich geschnitten. Die Punktmutation des inaktiven TLR13 führt zu einer Sequenzänderung, die es ermöglicht, mit dem Restriktionsenzym AuaI zu schneiden, während die Sequenz der aktiven TLR13 Rezeptors nicht durch AuaI geschnitten wird.

Nach doppelter Kontrolle, Restriktionsverdau und Sequenzierung, wurden die betreffenden TLR13 Expressionsplasmide (TLR13 Mutanten 1-3) in HEK293 Zellen überexprimiert. Letztere wurden dann mit Sa19 transfiziert. Während Zellen mit dem wt TLR13 Plasmid eine 40-fache Luziferase Induktion auslösten, waren die mutierten TLR13 überexprimierenden Zellen nicht reaktiv (Abbildung 22). Dieser Befund qualifizierte die betreffende *Tlr13*^{def/def} Maus als adäquates Experimentalsystem.

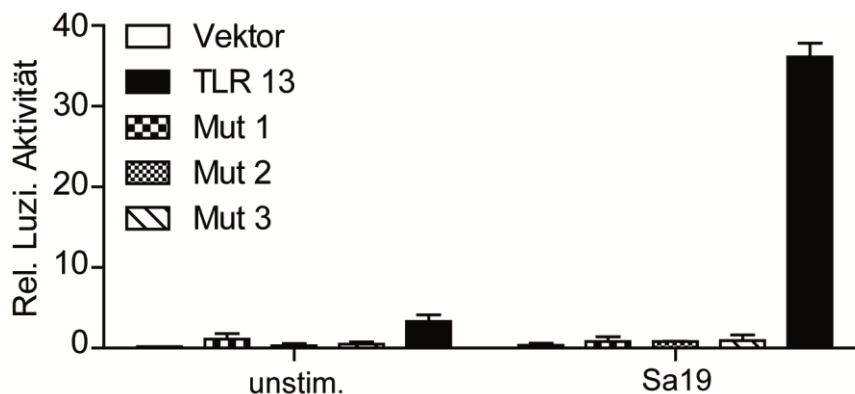


Abbildung 22: Punktmutation hebt stimulativen Effekt von SA19 auf. HEK293 Zellen wurden mit dem leeren Plasmid (Vektor), TLR13 und drei Klonen des mutierten TLR13 (Mut) transfiziert und mit 1 pmol des ORN Sa19 transfiziert. 16 h nach Inkubation wurde die Luziferaseaktivität untersucht.

Parallel führte ich in primären *TLR23479*^{-/-} Makrophagen einen mRNA *knock-down* des murinen TLR13 durch. Die Wirksamkeit der verschiedenen siRNAs wurden zunächst über die *Real-Time* Reverse-Transkription (RT) PCR getestet. Für TLR13 wurden jeweils vier siRNA Varianten auf ihren *knock-down* Effekt hin analysiert und die effektivste siRNA für die anschließenden Experimente ausgewählt (Abbildung 23). Als Kontrollen wurden eine negativ siRNA, *scramble* und unbehandelte Makrophagen untersucht. Die siRNA „TLR13-2“ war die wirkungsvollste aller vier RNAs und wurde folgend verwendet.

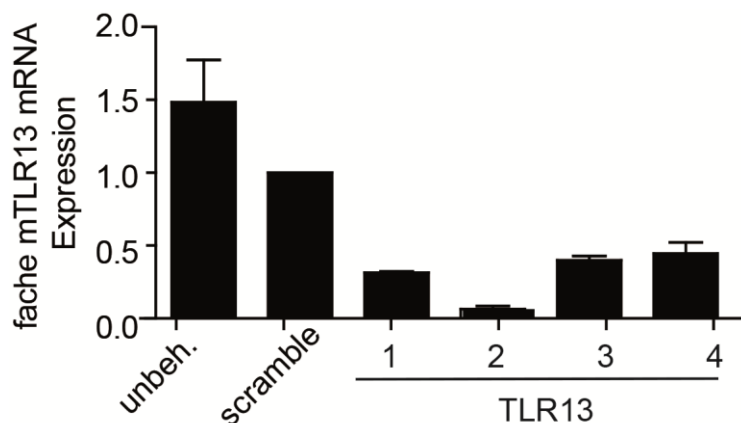


Abbildung 23: TLR13 spezifische siRNA Varianten hemmen TLR13 Expression. *Tlr23479*^{-/-} Makrophagen wurden mit vier unterschiedlichen Varianten TLR13 siRNA (50 pmol) elektroporiert. Per RT-PCR wurde die Genexpression untersucht. Als Negativkontrolle diente eine scramble siRNA.

Die zu Makrophagen ausdifferenzierten Knochenmarkzellen wurden mit Kontroll siRNA (scramble), einer Postivikontrolle siRNA (MapK1) und TLR13-2 elektroporiert, für 60 h inkubiert und anschließend über Nacht mit Sa19 transfiziert (Abbildung 24). Als Kontrolle des *knock-down* wurde der Überstand via ELISA auf die Zytokinproduktion untersucht und die Expression von TLR13 per Real-Time PCR kontrolliert. Die *scramble* siRNA, die MapK1 und die unbehandelten *TLR23479*^{-/-} Makrophagen wiesen eine normale TLR13 mRNA Expression auf. Die Elektroporation der gegen TLR13 gerichteten siRNA führte zu einem umfänglichen Verlust der TLR13 mRNA Expression (Abbildung 24).

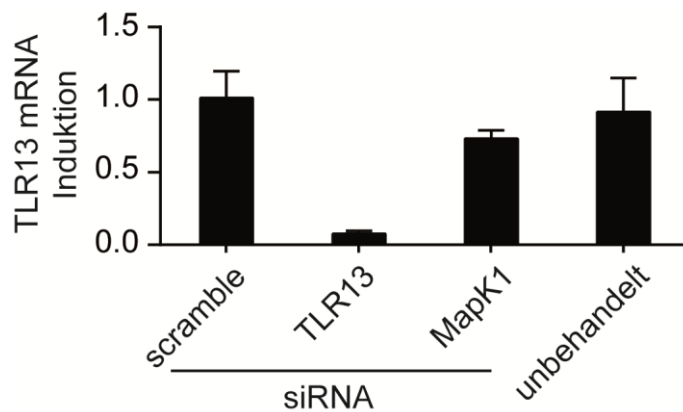


Abbildung 24: TLR13 spezifische siRNA inhibiert TLR13 mRNA Expression.

TLR23479^{-/-} Makrophagen wurden entweder mit einer Scramble (Negativkontrolle) oder einer siRNA (50 pmol) gegen TLR13 und MapK1 transfiziert. Die relative Quantifizierung der TLR13 mRNA wurde mittels RT-PCR untersucht.

Unbehandelte und mit der Kontroll-siRNA elektroporierte Makrophagen produzierten IL-6 nach Stimulation sowohl mit hiSa als auch mit Sa19. Der *knock-down* von MapK1 und TLR13 mRNAs führten zu einer signifikant reduzierten Zytokinproduktion nach Konfrontation mit hiSa sowie mit Sa19 (Abbildung 25). Der Effekt für den letzten Stimulus war deutlicher, weil TLR13 der einzige Rezeptor für die die 23S rRNA repräsentierende Sa19 Sequenz ist, während hiSa auch von Zellen mit eingeschränkter TLR13 Expression erkannt wird.

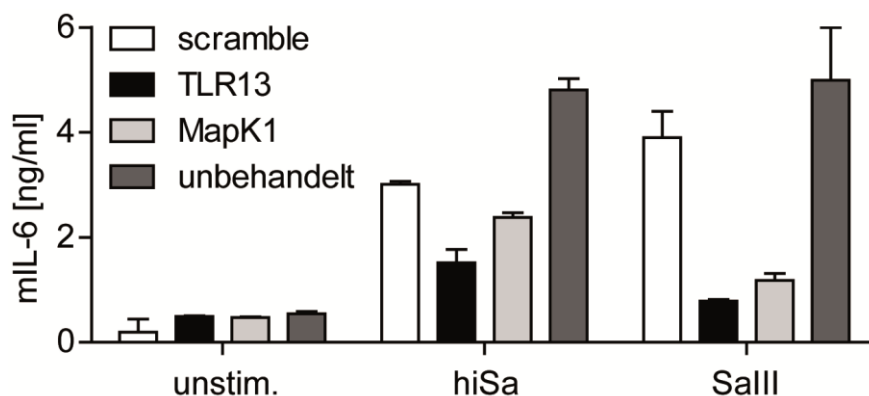


Abbildung 25: TLR13 *knock-down* in *Tlr23479^{-/-}* Makrophagen inhibiert die stimulative Wirkung von Sa111. Primäre Makrophagen defizient für TLR2, -3, -4, -7 und -9 wurden für 48 h mit siRNA (50 pmol) spezifisch für TLR13, MapK1 sowie einer Negativkontrolle (scramble) transfiziert und für weitere 16 h mit 100 pmol pro *well* ORN Sa111 inkubiert. Der Zytokingehalt wurde via ELISA untersucht.

3.1.5 Spezifizierung der stimulativen Sequenz der 23S rRNA

Um TLR13 in Bezug auf seine Sequenzspezifität hin zu charakterisieren, entwarfen wir Varianten des ORN SaIII. Einerseits reduzierten wir seine Größe weitgehend und andererseits wurden Mutationen und Modifikationen eingefügt (Tabelle 15). Das TLR13 stimulierende ORN Sa19 wurde auf 12 (Sa12) und 9 (Sa9) Nukleotide reduziert, um die Länge der aktivierenden Sequenz genauer zu untersuchen. Da Sa12 die kürzeste Variante mit aktivierendem Potential war, untersuchten wir das stimulierende Sequenzmotiv genauer. Die ORNS Sa12s1 – Sa12s12 tragen an der namensgebenden Stelle eine Punktmutation (Adenin (A), Cytosin (C), Guanin (G) oder Uridin (U)). Desweiteren wurden die ORNS, Sa19 und Sa12 im 6 und 7 Adenosin der Sequenz methyliert (Sa19m, Sa12m6, Sa12m7) und sogar die Variante Sa12m6_7 mit zwei Methylierungsstellen auf ihre Aktivierbarkeit hin untersucht.

Tabelle 15: Synthetische ORNS mit modifizierter 23S rRNA Sequenz. Sa19 Sequenz verkürzt zu Sa12 mit Methylierungen des Adenosins (blau) und Punktmutationen (Rot) in den Sa12 Varianten. Unterstrichen sind in der Arbeit verwendete Oligonukleotide. TLR13 aktivierende Sequenzen wurden mit einem + und nicht aktivierbare Varianten mit einem - gekennzeichnet.

Name	Sequenz (Richtung: 5`- 3`)	Stimuliert TLR13
<u>Sa19</u>	GGACGGAAAGACCCCGUGG	+
<u>Sa19m</u>	GGACGGAAAGACCCCGUGG	-
Sa12	GACGGAAAGACC	+
Sa12s1	AACGGAAAGACC	+
Sa12s2	GCCGGAAAGACC	+
Sa12s3	GAAGGAAAGACC	-
Sa12s4	GACAGAAAGACC	-
<u>Sa12s5</u>	GACGAAAAGACC	-
Sa12s6G	GACGGGAAGACC	-
Sa12s6U	GACGGUAAGACC	-
Sa12s7	GACGGACAGACC	-
Sa12s8	GACGGAAACGACC	-
Sa12s9	GACGGAAAACC	-
Sa12s10	GACGGAAAGCCC	-
Sa12s11	GACGGAAAGAAC	-
Sa12s12	GACGGAAAGACA	-
<u>Sa12m6</u>	GACGGAAAGACC	-
<u>Sa12m7</u>	GACGGAAAGACC	+
<u>Sa12m6_7</u>	GACGGAAAGACC	-
<u>Sa9</u>	GGAAAGACC	-

Zunächst wurde das Aktivierungspotential des methylierten Sa19 in wt Makrophagen getestet. Die Makrophagen induzierten ausschließlich nach Applikation des unmethylierten ORN Sa19, nicht aber nach Transfektion mit der methylierten Form Sa19m, eine dosisabhängige proinflammatorische Zytokinproduktion.

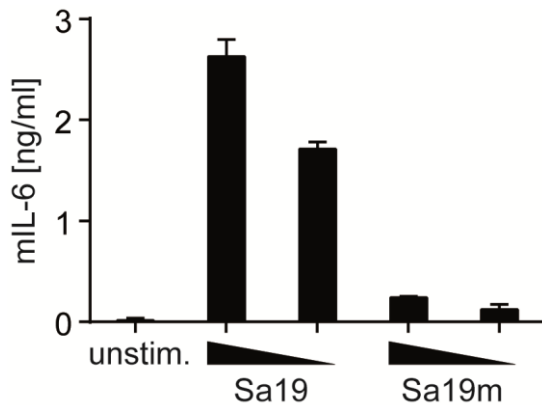


Abbildung 26: Das methylierte ORN Sa19 ist nicht stimulat. Wildtyp Knochenmarksmakrophagen wurden mit dem ORN Sa19 sowie der methylierten Form transfiziert (1 und 0,1 pmol). 16 h nach Inkubation wurde der Überstand mittels ELISA untersucht.

Desweiteren wurden *Tlr23479*^{-/-} Knochenmarkszellen mit den methylierten und unmethylierten Versionen von Sa12 in verschiedenen Konzentrationen transfiziert. Während Sa12 eine dosisabhängige IL-6 Induktion auslöste, konnte das ORN Sa12m6 mit der Methylierung am sechsten Nukleotid gar keine und Sa12m7, das eine Methylierung am sieben Nukleotid barg, lediglich eine verminderte Immunreaktion auslösen (Abbildung 27). Eine doppelte Methylierung am sechsten und siebten Nukleotid, Sa12m6_7, führte zu einer kompletten Blockade des aktivierenden Effekts. Die Methylierung des A6 in der Sequenz GACGGAAAGA, aber nicht das A7 (Sa12m7), führte zum Abbruch der TLR13-abhängigen Stimulation der Immunzellen.

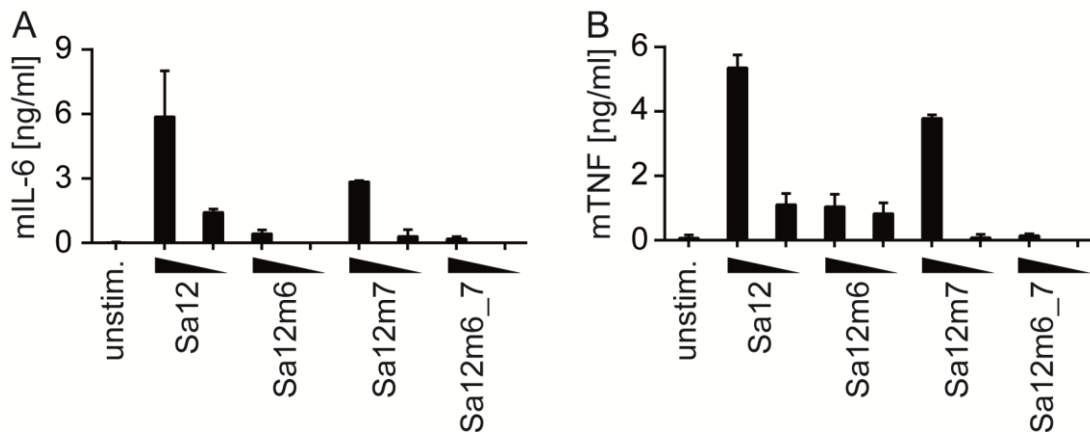


Abbildung 27: Eine spezifische Methylierung der Sa12 Sequenz verhindert die Induktion proinflammatorischer Zytokine. *Tlr23479*^{-/-} Makrophagen wurden mit Sa12 (1 pmol pro well) sowie den Varianten Sa12m6, Sa12m7 und der doppelt methylierten Form Sa12m6_7 transfiziert. Nach 16 h Inkubation wurde die (A) mIL-6 sowie die (B) mTNF Menge im Überstand via ELISA gemessen.

Letztendlich wurde die genaue Größe des minimalen aktivierenden 23S rRNA Fragments untersucht. Eine Serie von Sa12 Varianten mit spezifischen Punktmutationen wurden ebenfalls in *Tlr23479*^{-/-} Makrophagen transfiziert und deren aktivierende Eigenschaften per ELISA analysiert. Während Sa19 einen messbaren Zytokingehalt im Überstand aufwies, waren die Makrophagen nach Applikation der Mutationen Sa12s6, Sa12s6G und auch des gekürzte ORN Sa9 nicht responsiv (Abbildung 28). Die TLR13 aktivierende Sequenz ist den Ergebnissen zufolge abhängig von einer 12nt langen Sequenz, die durch Methylierung des A6 vor der Erkennung durch Immunzellen maskiert wird.

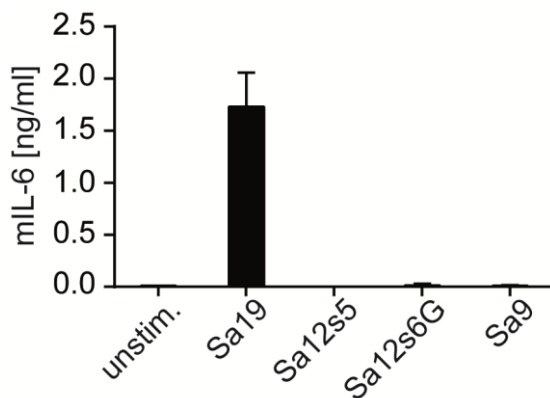


Abbildung 28: 12mer ORN als minimale stimulierende Sequenz. Primäre Makrophagen defizient für TLR2, -3, -4, -7 und -9 wurden mit den Oligonukleotiden Sa19, Sa12s5, Sa12s6G und der kurzen Form Sa9 (1 pmol pro well) transfiziert und für 16 h inkubiert. Der Überstand wurde auf seine IL-6 Menge hin untersucht.

3.2 Suche nach dem humanen Rezeptor von Sa19 als Surrogat immunstimulativer bakterieller RNA

Im Gegensatz zur Maus, die 12 TLR exprimiert, weist der Mensch lediglich 10 TLR auf. Wir fragten nach dem humanen TLR13 Äquivalent. Zunächst untersuchten wir humane Immunzellen auf ihre Empfindlichkeit für das ORN „Sa19“. Dazu wurden aus buffy coats wie beschrieben mononukleare Zellen des peripheren Blutes (*human peripheral blood mononuclear cells*, PBMC) isoliert. Diese Zellen wurden mit Sa19 sowie der methylierten Variante Sa19m (methyliert A2059) transfiziert. Bemerkenswerterweise produzierten die TLR13 defizienten humanen Zellen proinflammatorische Zytokine sowohl nach Transfektion der unmethylierten wie auch der methylierten Sa19-stummen Variante (Abbildung 29). Somit bestätigte sich nicht lediglich die Annahme, dass die 23S rRNA auch im Menschen eine Immunantwort auslöst, sondern wies auch auf eine verminderte Spezifität des unbekannten PRR hin und damit seine Fähigkeit selbst durch Methylierung „getarnte“ Bakterien über ihre RNA zu erkennen.

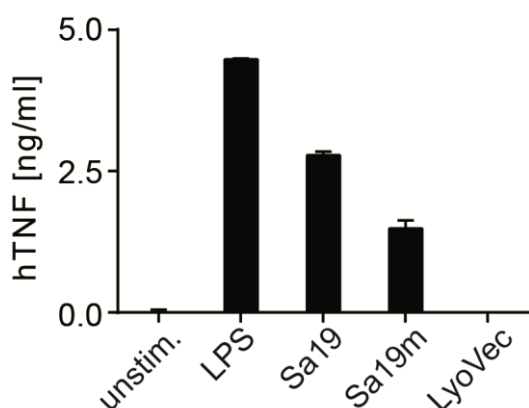


Abbildung 29: hPBMC erkennen die methylierte und unmethylierte Sa19 Sequenz. HPBMCs wurden mit LPS (0,1 µg/ml) stimuliert und mit den ORN Sa19 sowie Sa19m (je 0,5 pmol) mit LyoVec transfiziert. Die Überstände wurden nach 16 h auf den TNF Gehalt hin via ELISA untersucht.

3.2.1 Etablierung einer auf Sa19 reagierenden Zelllinie

Mit dem Ziel, ein robustes Zellsystem für einen genomweiten „screen“ im Rahmen einen funktionalen Assay aufzubauen, suchten wir eine humane Zelllinie, die wie PBMC auf Sa19 reagiert. Wir sammelten ~20 Zelllinien an, namentlich T-, B-, Melanom-, monocytoide und epi/endotheliale Zellen sowie Fibroblasten (Tabelle 16). Keine dieser Zellen reagierten auf Sa19 Konfrontation mit der Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF, IL-8 oder IL-6.

Tabelle 16: Auf ihre Responsivität gegenüber Sa19 und BtmtD3_4 getestete humane primäre und Zelllinien. Die zur Verfügung gestellten Zellen wurden nach Angaben der Datenbank oder des Herstellers kultiviert und mit den ORN Sa19 und BtmtD3_4 mittels DOTAP, pLA oder LyoVec transfiziert. Kontrollstimuli waren LPS, RNA40, CL075 oder R848 (0,1 µg/ml, 0,5 µg/ml, 2,5 µg/ml, 10 µg/ml) Die Zytokinmenge im Überstand wurde nach 16 h via ELISA gemessen.

	Zelllinie	Phänotyp	Zelltyp	Herkunft (zur Verfügung gestellt von)
1	Ma-Mel-65	Adhärent	melanoma	A. Paschen
2	Ma-Mel-119	Adhärent	melanoma	A. Paschen

3	Ma-Mel-47	Adhärent	melanoma	(Heinemann et al. 2012)
4	K562	Suspension	erythromyeloblastoid leukemia	ATCC: CCL-243
5	HepG2	Adhärent	hepatocellular liver carcinoma	ATCC: HB-8065
6	HEL	Suspension	erythroid leukemia	DSMZ No. ACC11/ATCC 11b-180
7	Chang Liver	Adhärent	derived from HeLa	ATCC: CCL-13
8	Jurkat	Suspension	T cell lymphoblast-like	ATCC: TIB-152
9	UM22b	Adhärent	head and neck squamous cell carcinoma	S. Brandau Ajay Verma (Merck & Co, North Wales, PA, USA)
10	FaDu	Adhärent	hypopharyngeal carcinoma	ATCC: HTB-43
11	DLD-1	Adhärent	colon adenocarcinoma	ATCC: CCL-221
12	MonoMac 6	Suspension	acute monocytic leukemia derived	DSMZ No. ACC124
13	5637	Adhärent	bladder carcinoma	ATCC: HTB-9
14	KG1a	Suspension	acute myeloid leukemia	ATCC: CCL-246.1
15	KG1	Suspension	acute myeloid leukemia c	ATCC: CCL-246
16	THP-1	Suspension	acute monocytic leukemia	V. Hornung, Bonn
17	U937	Suspension	leukemic monocyte lymphoma	ATCC: CRL-1593.2
18	Fibroblast C3	Adhärent	transformation with an origin-defective mutant of SV-40	(Picard et al. 2003)
20	Fibroblast <i>Tirap^{-/-}</i>	Adhärent	transformation with an origin-defective mutant of SV-40	(Picard et al. 2003)
21	B-cells	Suspension	mortalized with Epstein-Barr virus (EBV)	(Picard et al. 2003)
22	Huh-7	Adhärent	Differentiated hepatocyte derived cellular carcinoma	Cell Bank: JCRB0403J

Parallel identifizierte Chiranjeevi Chebrolu in unserer AG ein Segment in der mitochondriellen (mt) 16S rRNA von *Bos taurus* (BtmtD3_4), das eine mit jener von Sa19 identischen Kernsequenz aufweist (Abbildung 30). Bereits 2010 waren mitochondrielle DAMPs als Auslöser der sterilen Inflammation z. B. *systemic*

inflammatory response-syndrom (SIRS) impliziert und DNA als immunstimulativ identifiziert worden (Zhang et al. 2010). Die Endosymbiontentheorie erklärt die Erkennung mitochondriellen Materials als fremd. Bereits zu Beginn des 20. Jahrhunderts wurde die zunächst als Hypothese formulierte Theorie der Endozytose von verschiedene Organismen postuliert (Gray et al. 2001). Mitochondrien sowie Chloroplasten waren demnach eigenständige chemotrophe bzw. phototrophe Prokaryoten, die per Phagozytose von anderen prokaryotischen Zelle (Archaeen) aufgenommen wurden und unnötiges Genmaterial während der Evolution reduzierten. Unterstützt wird diese Theorie durch den prokaryotisch ähnlichen Aufbau z. B. eine ringförmige DNA, die im Gegensatz zur eukaryotischen DNA nicht an Histon gebunden ist, eine Doppelmembran sowie ein eigenes Ribosomen. Ein synthetisches ORN namentlich BtmtD3_4 mit identischer Kernsequenz zu Sa19 wurde auf seine aktivierende Eigenschaft hin untersucht.

Sa19	GGACIGGAAAGAICCCCGUGG	mTLR13
BtmtD3_4	AUCUAAIGGAAAGAIUUAAAA	?

Abbildung 30: Identische Sequenz von mitochondrieller 16S und bakterieller 23S ribosomaler RNA. Sa19 mit der Sequenz der bakteriellen 23S rRNA weist eine zur mitochondriellen 16S rRNA identische Kernsequenz auf (schwarz dargestellt).

Wir applizierten dieses ORN zu Kulturen von PBMC. Das 16S mitochondrielle RNA-Derivat „BtmtD3_4“ induzierte eine signifikant höhere Zellaktivität als das die 23S rRNA enthaltene ORN Sa19 (Abbildung 31). Gleichwohl aktivierte BtmtD3_4 weder zellulär noch systemisch das murine Immunsystem (Daten nicht gezeigt). Wir verwendeten nun BtmtD3_4 zusätzlich zu Sa19 auf der Suche nach einer geeigneten Zelllinie.

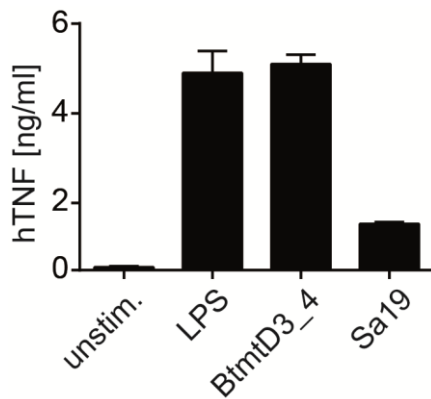


Abbildung 31: Mitochondrielle 16S rRNA Sequenz stimuliert hPBMC. Der Überstand von PBMC konfrontiert mit LPS (0,1 µg/ml) sowie den ORN BtmtD3_4 und Sa19 (0,5 pmol) wurde anschließend nach 16 h auf seinen Zytokingehalt hin untersucht.

Da PBMC neben Lymphozyten wie B-, T- und NK-Zellen zahlreiche Zellpopulationen wie z. B. Monocyten und Makrophagen beinhalten, konzentrieren wir unsere Untersuchungen auf letztere Zelltypen. Die Literatur beschreibt wie auf unterschiedlichste Weise monocytoide THP-1 Monozyten zu Makrophagen ausdifferenziert werden. Wir wählten punktuell vier Methoden aus. Die Anwendung einer davon war erfolgreich, was sich in der ligandenabhängigen Produktion von hIL-8 zeigte (Abbildung 32). Undifferenzierte und für 8 Tage mit PMA ausdifferenzierte (ddi) THP-1 Zellen zeigten keine Responsivität gegenüber Sa19 noch BtmtD3_4. Hingegen induzierten 3 Tage mit PMA ausdifferenzierte THP-1 Zellen eine erhöhte hIL-8 Produktion nach Konfrontation mit Sa19 und einer stärkeren Induktion mit BtmtD3_4.

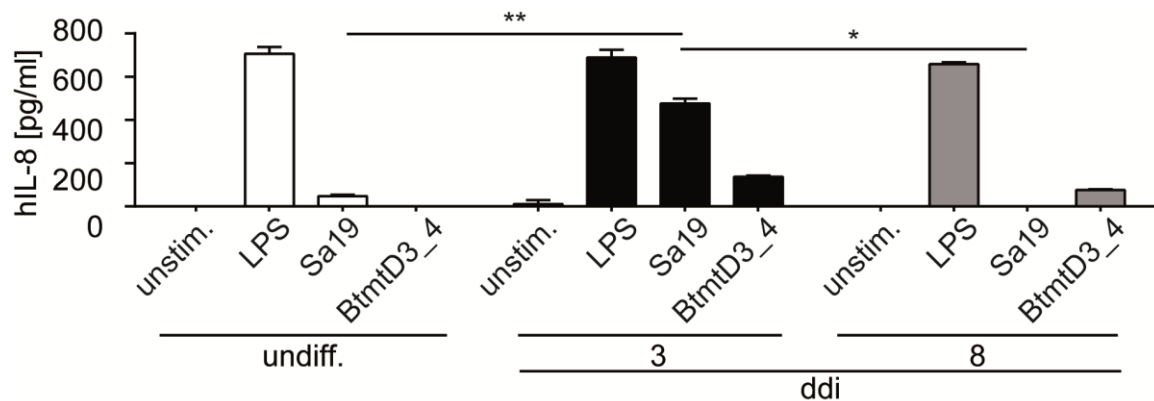


Abbildung 32: 3 Tage, aber nicht undifferenzierte und 8 Tage differenzierte THP-1 Zellen reagieren auf die ORN. THP-1 Zellen undifferenziert (undiff) sowie 3 und 8 Tage mit PMA (200 nM) ausdifferenzierte (ddi) Zellen wurden mit LPS (0,1 µg/ml und mit hitzeinaktivierten *S. aureus* (hiSA, 10^7) stimuliert. Je 0,5 pmol Sa19 (Lipofectamin2000) und BtmtD3_4 (pLA) wurden transfiziert und nach 16 h der Überstand via ELISA analysiert.

Aus den drei, namentlich undifferenzierten, 3- und 8 Tage differenzierten THP-1 Zellen, isolierten wir Gesamt-RNA, um im nächsten Schritt eine genomweite Transkriptom-Analyse durchzuführen. Deren Ziel war es, nach 3 Tagen Differenzierung (3ddi) relativ zu den anderen beiden Proben aufregulierte RNA Spezies zu identifizieren und daraus die besten Kandidaten für RNA-erkennende PRR auszuwählen sowie die Genprodukte zu charakterisieren. Wir identifizierten zellmembrandurchspannende, zytoplasmatische und endogene PRRs, von denen wir die auswählten, die in 3ddi THP-1 Zellen 2fach aufreguliert waren. Die G-Protein gekoppelten Rezeptoren FPR1 und 3 (*formyl peptide receptor 1*), bekannt als Sensor bakterieller Formyl-Peptide (fMLP), SIGEC1 (*sialic acid binding IG-like lectin1*), erkennt Glykokonjugate, DDX58 (Asp-Glu-Ala-Asp box polypeptide 58), das in der Erkennung viraler dsRNA eine Rolle spielt und Mitglieder der C-Typ Lektine, namentlich CLEC4A (*C-type lectin domain family 4, member A*) und CLEC7A (*C-type lectin domain family 4, member A*). Aus unserer Sicht am interessantesten war jedoch die Aufregulierung von TLR8 (Abbildung 33).

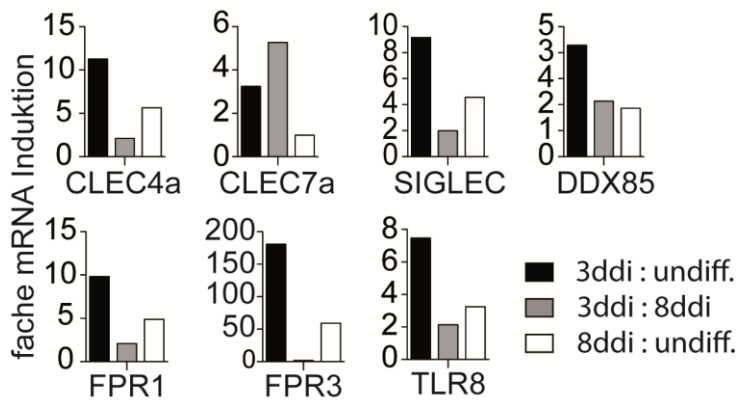


Abbildung 33: Die mRNA von TLR8 wird 2fach im Vergleich von undiff. 3 und 8 Tagen ausdifferenzierten THP-1 Zellen aufreguliert. Vergleich der mRNA Induktion zwischen 3 Tage ausdifferenzierten (3ddi) gegen undifferenzierte (undiff.) sowie 3ddi gegen 8 Tage ausdiff. (8ddi) und 8ddi gegen undiff. THP-1 Zellen.

Es erwies sich, dass die Ausdifferenzierung der Zelllinie U937, einer ebenfalls monozytären Zelllinie, unter keinen Bedingungen stimulierbar war (Daten nicht gezeigt). 3 Tage differenzierte (3ddi) THP-1 Zellen setzten auf Konfrontation mit BtmtD3_4 hauptsächlich TNF, IL-6, IL12 und IL-8 frei, ein Befund, der per Luminex-Assay erhoben wurde. Wegen ihrer herausragenden Rollen in der Pathogenität der Sepsis wählten wir die Produktion der ersteren als *read-out* für unsere Folgestudien aus. Wir prüften verschiedene Transfektionsreagenzien auf ihre Effektivität hin. Über eine Dosiskinetik, bei der die ORN Sa19 und BtmtD3_4 mittels LyoVec, pLA, Lipofectamin 2000 und Dotap transfiziert wurden, ermittelten wir das jeweils effektivste Reagenz (Abbildung 34). Während Sa19 transfiziert mit Lipofectamin 2000 die höchste hIL-12 Induktion auslöste, war die Zellaktivierung mit BtmtD3_4 bei Verwendung von pLA (*poly-L-arginine hydrochloride*) am höchsten, als ob letzteres besser in das Endosomen aufgenommen wurde. Eine mögliche Erklärung der besseren Effektivität in Form der stärkeren Stimulation könnte sein, dass pLA positiver geladen ist als z. B. das ebenso als kationische Polypeptid geeignete Transfektionsreagenz LyoVec. Die durch die Phosphatgruppen negativ geladene RNA bindet somit stabiler an das Reagenz.

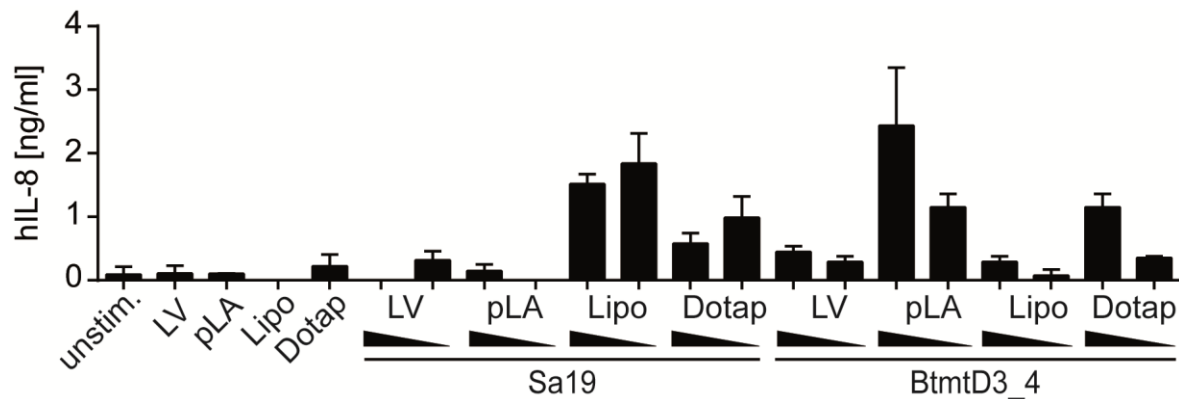


Abbildung 34: Vergleichende Evaluierung von vier ausgewählten Transfektionsreagenzien. Bezug auf die Effektivität bei der Transfektion von Sa19 und BtmtD3_4. Je zwei Dosen ORN (0,5 und 0,25 pmol) wurden mit LyoVec (LV), pLA, Lipofectamin 2000 (Lipo) und Dotap in 3ddi THP-1 Zellen transfiziert.

3.2.2 Rolle von endosomalen TLRs in der Erkennung von aus der mitochondriellen 16S und der bakteriellen 23S rRNA ausgewählten Segmenten

Da der *gene-array* von unterschiedlich ausdifferenzierten THP-1 Zellen den Hinweis auf eine erhöhte Genexpression von hTLR8 nach drei Tagen gab, untersuchten wir die Involvierung der endosomalen TLRs nach Stimulation mit den synthetischen ORNs. Hierfür wurden 3ddi THP-1 Zellen mit Cytochalasin D, Chloroquin oder einer inhibierenden DNA gegen die Rezeptoren TLR7, -8 und -9 (79i) für 2 h inkubiert. Cytochalasin D gehört der Klasse der Mykotoxine an und inhibiert die Aktin-Polymerisierung und somit die Endozytose. Chloroquin wurde 1934 von Hans Andersag synthetisiert und dient heute zur Behandlung von Malaria und Rheuma. Es wirkt als endosomaler Hemmer und neutralisiert das Milieu innerhalb der Endosomen, die somit nicht zu Lysosomen reifen können.

Die Zellen wurden anschließend mit dem TLR4 Liganden LPS und als Kontrolle der endosomalen Hemmung mit RNA40 sowie der mitochondriellen Total-RNA für 16 h inkubiert. LPS induzierte eine Zytokinproduktion in den Zellen in An- oder Abwesenheit der Inhibitoren (Abbildung 35). Hingegen wurde die durch die ORN in unbehandelten Zellen ausgelöste TNF Expression durch Zugabe der Inhibitoren

vollständig gehemmt, was auf eine essentielle Rolle eines endosomalen TLR in der Erkennung der RNA hindeutete.

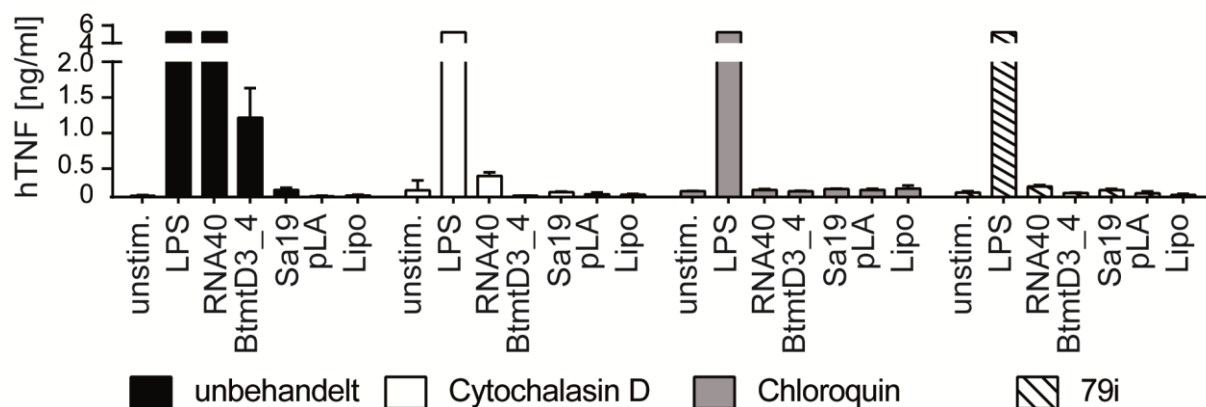


Abbildung 35: Erkennung der ORN Sa19 und BtmtD3_4 ist durch Inhibition endosomalen TLR blockiert. 3ddi THP-1 Zellen wurden für 1 h mit den endosomalen Inhibitoren Cytochalasin D (1 µg/ml), Chloroquin (5 µg/ml) und dem spezifischen ODN gegen TLR7, -8 und -9, namentlich 79i (10 µM) vorinkubiert. LPS (0,1 µg/ml) wurde appliziert und die ORN RNA40 (0,5 µg/ml) sowie je 0,5 pmol BtmtD3_4 (mit pLA) und Sa19 (mit Lipofectamin, Lipo) transfiziert. Die TNF Menge im Überstand wurde nach 16 h Inkubation via ELISA untersucht.

Zur Kontrolle wurden die primären PBMCs ebenfalls für 2 h mit den Inhibitor Cytochalasin D und Chloroquin inkubiert und auf ihre Responsivität hin untersucht. Der Inhibitor Chloroquin hemmte die Produktion von IL-6 als auch von TNF im Hinblick auf die Aktivierung durch RNA40, wohingegen die Zellstimulation mit Pam3CSK4 und LPS nicht beeinflusst wurde (Abbildung 36). Deshalb wurde für weitere Versuche Chloroquin zur Inhibition endosomaler TLRs eingesetzt.

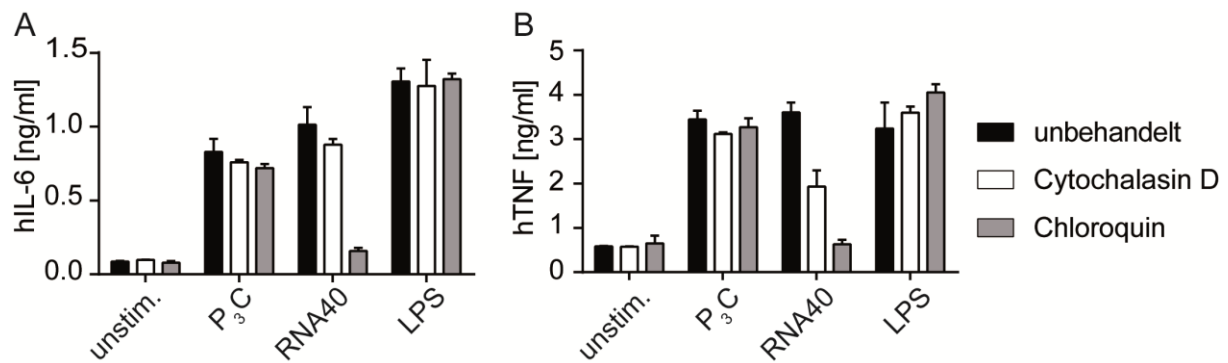


Abbildung 36: Chloroquin hemmt auf Stimulation mit RNA40 hin effektiver als Cytochalsin D. PBMC wurden unbehandelt oder für 1 h mit Cytochalsin D (1 µg/ml) und Chloroquin (5 µg/ml) inkubiert. Nach 16 h Stimulation mit Pam₃CSK₄ (P₃C, 1 µg/ml), LPS (0,1 µg/ml) und RNA40 (0,5 µg/ml) wurde der Überstand per ELISA auf die (A) IL-6 und (B) TNF Menge hin analysiert.

Anschließend wurde die Responsivität der PBMC nach Inhibition mit Chloroquin und anschließender Transfektion der ORN sowie der Kontrolle RNA40 auf ihre Responsivität hin untersucht. Die Inaktivierung der endosomalen Rezeptoren führte wie auch in den THP-1 Zellen zu einem signifikanten Verlust der Induktion pro-inflammatorischer Zytokine gegenüber BtmtD3_4 und RNA40 (Abbildung 37).

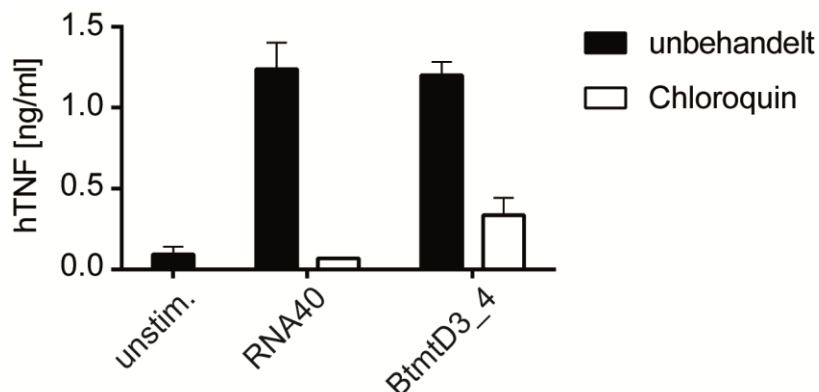


Abbildung 37: Die Inhibition endosomaler Rezeptoren blockiert die Aktivierung von hPBMCs auf Konfrontation mit dem ORN. PBMCs wurden mit und ohne Chloroquin (5 µg/ml) 1 h vorinkubiert und mit RNA40 (0,5 µg/ml) und dem ORN BtmtD3_4 (0,5 pmol) transfiziert. 16 h nach Applikation wurde der Überstand mittels ELISA auf seinen Zytokingehalt hin untersucht.

Aus einer Kooperation mit Prof. V. Hornung, Molekulare Medizin in Bonn, resultierten für uns der Erhalt von THP-1 Zellen, welche defizient für das Chaperon Unc93B1 sind. Durch die CRISP/cas9 Methode wurde der Leserahmen (Reading-Frame) des Gens verändert, was zum Verlust der Intaktheit des Proteins führte (Schmid-Burgk et al. 2014). Die parentalen sowie die *Unc93b1*^{-/-} THP-1 Zellen wurden 3 Tage differenziert und mit den ORN RNA40, Sa19 und BtmD3_4 transfiziert. Während die Positivkontrolle (Pam3CSK4) sowohl in den parentalen wie auch in den *Unc93B1*^{-/-} Zellen eine TNF Freisetzung auslöste, induzierten die ORN ausschließlich in den parentalen Zellen eine Immunantwort (Abbildung 38). Dies untermauerte unsere Hypothese demzufolge ein endosomaler TLR die Erkennung von Sa19 und auch das ORN BtmD3_4 vermittelt.

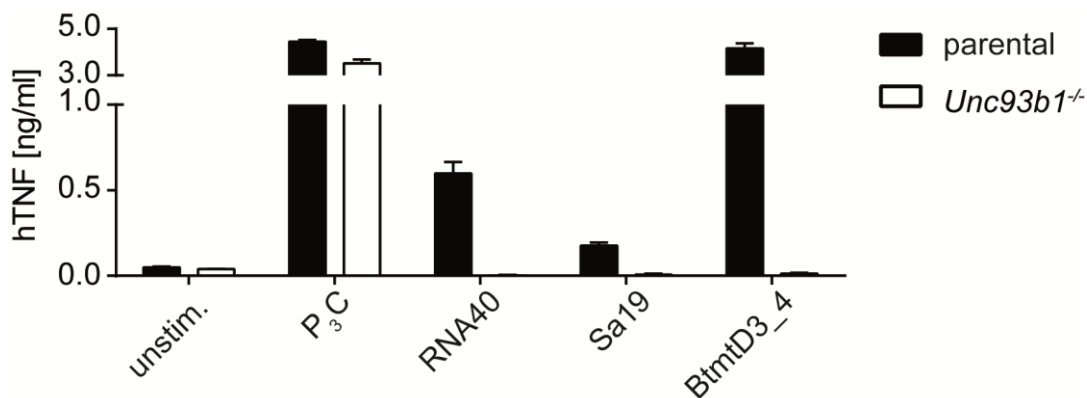


Abbildung 38: 3ddi *Unc93b1*^{-/-} THP-1 Zellen induzieren keine proinflammatorischen Zytokine nach Konfrontation mit den ORN Sa19 oder BtmD3_4. Parentale sowie *Unc93b1*^{-/-} THP-1 Zellen wurden mit Pam₃CSK₄ (P₃C, 1 µg/ml) stimuliert und mit den ORN RNA40 (0,5 µg/ml), Sa19 und BtmD3_4 (jeweils 0,5 pmol) transfiziert.

Zusätzlich zu den synthetischen ORNs wurde die Total-RNA sowie die großen ribosomalen RNAs 23S und 16S rRNA von *S. aureus* und *E. coli* in parentale und *Unc93b1*^{-/-} THP-1 Zellen transfiziert. Wie zu erwarten war, setzten letztere eine signifikant verminderte Menge von Zytokinen im Gegensatz zu den parentalen THP-1 Zellen frei (Abbildung 39). Es wurde auch kein substantieller Unterschied zwischen der Stimulativität Gram-positiver und Gram-negativer RNA festgestellt.

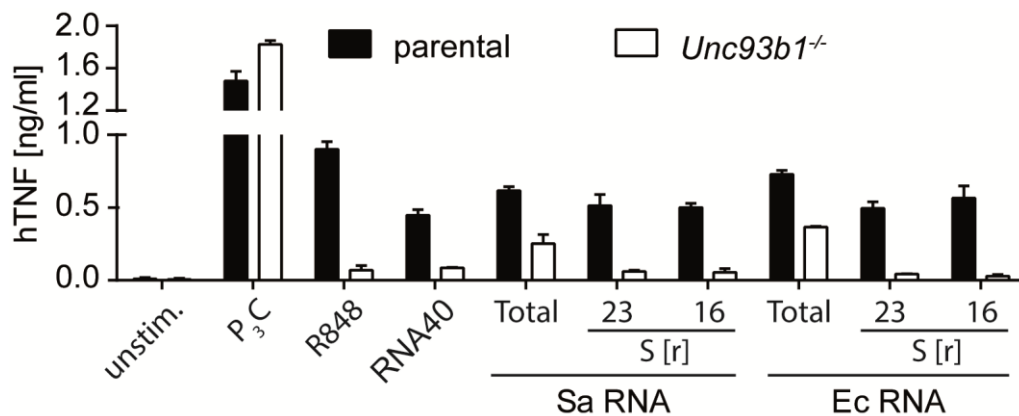


Abbildung 39: 3ddi parentale, aber nicht *Unc93b1*^{-/-} THP-1 Zellen erkennen Gram-positiv und -negativ bakterielle RNA. 3ddi parentale und *Unc93b1*^{-/-} THP-1 Zellen wurden mit Pam₃CSK₄ (P₃C, 0,1 µg/ml) und R838 (10 µg/ml) stimuliert. RNA40 (0,5 µg/ml) sowie die Total-RNA (1 µg/ml), die 23S und 16S rRNA (600 ng) von *S. aureus* (Sa) oder *E. coli* (Ec) wurden mit Lipofectamin 2000 transfiziert. Nach 16 h Inkubation wurde der Zytokingehalt im Überstand via ELISA untersucht.

Um zu überprüfen, ob die Gram-negativ bakterielle RNA nicht durch LPS verunreinigt war, wurde die Total-RNA vor der Transfektion wie beschrieben mit Polymyxin B behandelt. Das zur Gruppe der Polypeptid-Antibiotika gehörende Polymyxin B bindet LPS, spaltet seine Supramolekülstruktur und hemmt somit die Toxizität (Cardoso et al. 2007). Da die großen ribosomalen RNAs nach elektrophoretischer Auftrennung aufgereinigt wurden, war hier eine Kontamination mit LPS ausgeschlossen. Die reine und mit Polymyxin behandelte Total-RNA von *S. aureus* (Kontrolle) und *E. coli* wurden wie die großen ribosomalen RNAs in PBMCs transfiziert (Abbildung 40). Die unbehandelten PBMCs reagierten auf die mit Polymyxin inkubierte RNA genauso stark wie auf die unbehandelte RNA. Hingegen war die TNF-Freisetzung in den mit Chloroquin behandelten Zellen signifikant reduziert. Die Stimulation durch RNA40 sowie die der ORN war in den endosomal gehemmten PBMCs massiv oder gar komplett inhibiert, während hitzeinaktivierte *S. aureus* eine ähnliche Zytokinausschüttung in mit und ohne Chloroquin behandelten Zellen provozierten.

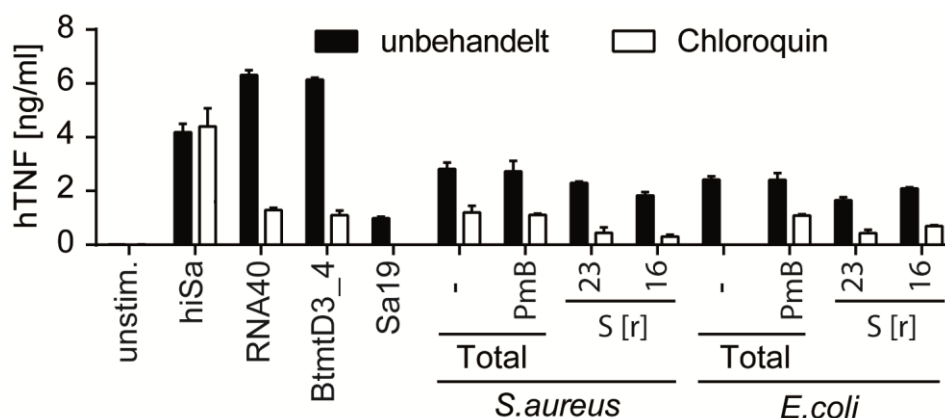


Abbildung 40: Die Responsivität von PBMCs konfrontiert mit Gram-negativ bakterielle RNA ist nicht LPS abhängig. PBMCs wurden mit und ohne Chloroquin (5 µg/ml) für 1 h vorinkubiert und anschließend mit hitzeinaktivierten *S. aureus* (hiSa, 10^7 cfu/ml) RNA 40 (0,5 µg/ml), BtmtD3_4 (0,5 µg/ml) konfrontiert. Die Total-RNA von *S. aureus* und *E. coli* wurde unbehandelt oder mit Polymyxin B (PmB, 50µg/ml; 1 h bei 37°C) inkubiert und jeweils 1 µg sowie 400 ng der 23S und 16S rRNA (Lipofectamin 2000) auf die Zelle appliziert. 16 h nach Inkubation wurde der Zellüberstand per ELISA auf seinen TNF Gehalt hin untersucht.

3.2.3 hTLR8 erkennt mitochondrielle und bakterielle ribosomale RNA

Nach der Quantifizierung von hTLR8 als bester Kandidat für den gesuchten Rezeptor per *gene-array* Untersuchung, sowie die Implikation eines endosomalen TLR in Bezug auf seine potentielle Rolle in der Erkennung des die 23S rRNA Sequenz enthaltenden ORN Sa19 und andererseits des 16S mtrRNA Derivates BtmtD3_4 charakterisiert.

Die Überexpression der humanen endosomalen TLR3, -7 und -9 allein und in Kombination vermittelte keine promotorgetriebenen Luziferaseaktivität. Allerdings wurden hTLR8 überexprimierende HEK293 Zellen nach Inkubation mit Sa19 und in einem höheren Maß mit BtmtD3_4 stimuliert (Abbildung 41 A). Die Kontrolle CL075 (Thiazol Derivat, bekannter TLR8 Ligand) induzierte eine 6fache Luziferaseaktivität, während die Transfektionsreagenzien Lipofectamin 2000 und Lyovec alleine keine Stimulation hervorriefen (nicht gezeigt). Durch die Überexpression von hTLR8 in murinen RAW247.6 Zellen induzierten diese nach Konfrontation mit dem ORN BtmtD3_4 die NFκB abhängige Luziferaseaktivität (Abbildung 41 B). Das ORN Sa19 stimulierte TLR13 in RAW247.6 Zellen transfiziert mit dem leeren Vektor.

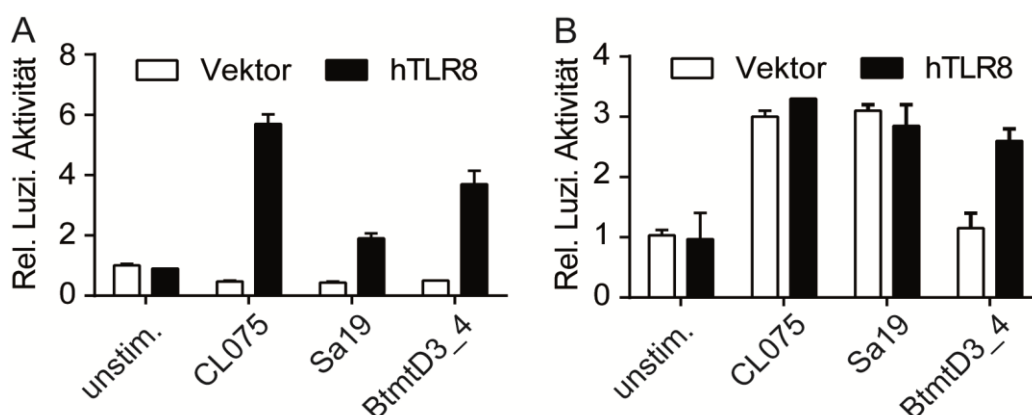


Abbildung 41: BtmtD3_4 wird lediglich über den humanen TLR8 erkannt. Der Leervektor (Vektor), hTLR8 (30 ng) und ein 6xNF κ B Promotor wurden in (A) humane HEK293 Zellen und (B) murine RAW247.6 Zellen transfiziert. Die Zellen wurden mit CL075 (2,5 μ g/ml) stimuliert und die ORN Sa19 und BtmtD3_4 transfiziert. 16 h nach Inkubation wurde die relative Luziferaseaktivität (Rel. Luzi. Aktivität) gemessen.

Nachdem wir durch die Überexpression die Aktivierung von hTLR8 durch die ORN zeigten, sollte nun durch spezifische Aufhebung der TLR8 Funktion der Verlust der Responsivität dargestellt werden. In „Pilotexperimenten“ wurde das geeignetste Transfektionsreagenz sowie die effektivste siRNA gegen hTLR8 mRNA charakterisiert. Der *knock-down* von hTLR8 in 3ddi THP-1 Zellen wurde via RT-PCR nachgewiesen. Als Negativkontrolle diente eine *scramble* siRNA, welche die Expression von TLR8 mRNA im Vergleich zu unbehandelten Zellen nicht beeinflusste (Abbildung 42). Die zielgerichtete siRNA hingegen führte zu einem signifikanten Verlust der Genexpression.

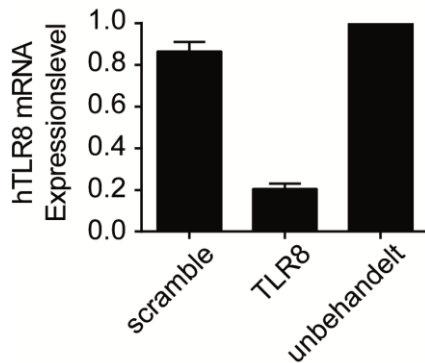


Abbildung 42: siRNA *knock-down* von hTLR8 verifiziert via RT-PCR.

3ddi parentale THP-1 Zellen wurden unbehandelt oder mit einer Negativkontrolle (*scramble*) und TLR8 siRNA (je 16 nM) mit Lipofectamine RNAiMAX transfiziert. Nach 24 h Inkubation wurde das mRNA Expressionslevel von TLR8 via RT-PCR analysiert. Die Expression der unbehandelten Zellen wurde auf 1 gesetzt.

Der 80%ige Verlust der TLR8 Genexpression führte zu einer signifikanten Reduktion der Zytokininduktion nach Konfrontation mit dem ORN BtmtD3_4 (Abbildung 43). Auch der Kontrollstimulus R848 induzierte eine verminderte TNF Freisetzung in Zellen, die mit der siRNA gegen hTLR8 transfiziert worden waren. Als Positivkontrolle der Zellviabilität diente Pam₃CSK₄, das eine ähnlich starke Zytokininduktion in den siRNA *scramble* und TLR8 transfizierten wie auch in den unbehandelten THP-1 Zellen auslöste. Das Transfektionsreagenz (pLA) für das BtmtD3_4 ORN führte hingegen allein zu keiner Immunreaktion.

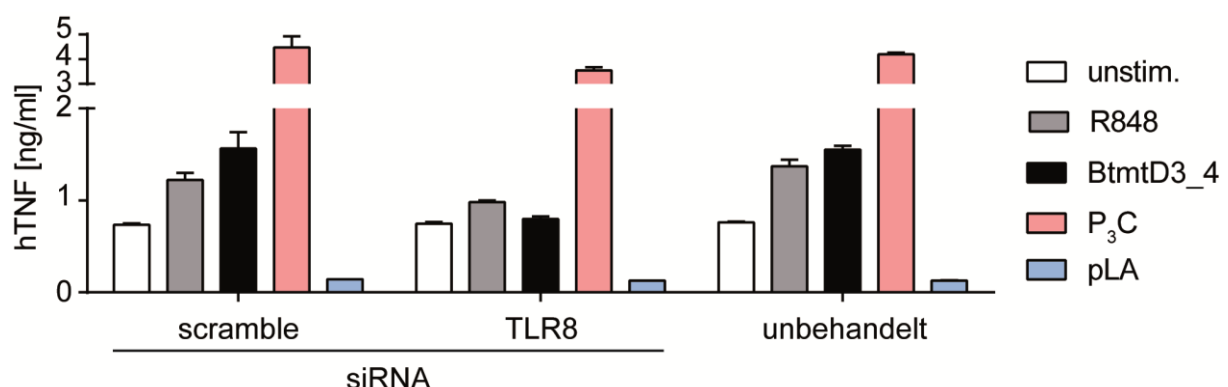


Abbildung 43: Der *knock-down* von TLR8 per siRNA in 3ddi THP-1 Zellen inhibiert die Responsivität auf mtrRNA Applikation. 3ddi THP-1 Zellen wurden mit einer Kontrolle (*scramble*) oder TLR8 siRNA (16 nM) transfiziert. Unbehandelte oder mit siRNA transfizierte

Zellen wurden anschließend mit R848 (10 µg/ml), Pam₃CSK₄ (P₃C, 1 µg/ml), BtmtD3_4 (0,5 pmol) und dem Transfektionsreagenz pLA für weitere 16 h inkubiert.

Das Fehlen der Reaktivität von *Tlr8*^{-/-} 3ddi THP-1 Zellen (V. Hornung) bestätigte obigen Befund, dass TLR8 einzelsträngiger RNA der von uns untersuchten Art erkennt. 3ddi parentale und *Tlr8*^{-/-} THP-1 Zellen reagierten ähnlich auf den Stimulus Pam₃CSK₄ (Abbildung 44), während die *Tlr8*^{-/-} Zellen keine proinflammatorischen Zytokine nach Inkubation mit den ORN BtmtD3_4 und Sa19 induzierten. Der *knock-out* wies ebenfalls einen Funktionsverlust in Bezug auf die Reaktivität nach Konfrontation mit den Positivkontrollstimuli R848 und RNA40 auf.

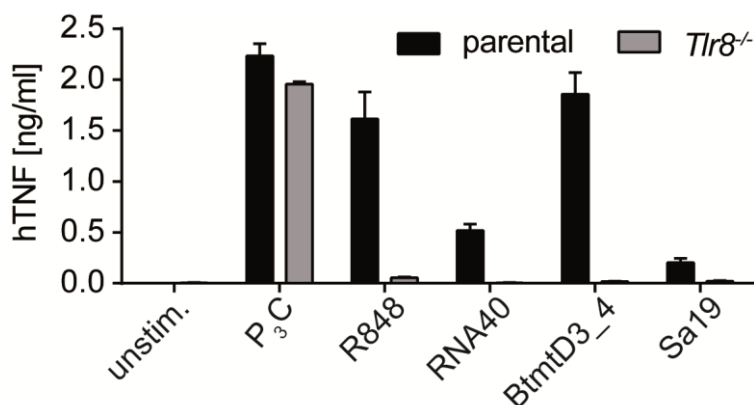


Abbildung 44: 3ddi *Tlr8*^{-/-} THP-1 Zellen induzieren kein TNF nach Applikation der ORN. Auf 3ddi parentale und *Tlr8*^{-/-} THP-1 Zellen wurden mit Pam₃CSK₄ (P₃C, 1 µg/ml), R848 (10 µg/ml) sowie den ORN RNA40 (0,5 µg/ml), BtmtD3_4 und Sa19 (0,5 pmol) konfrontiert. 16 h nach Inkubation wurde der Zellüberstand auf seinen TNF Gehalt hin untersucht.

Wie in Abbildung 39 gezeigt, wurden auch *Tlr8*^{-/-} 3ddi THP-1 Zellen mit Total-RNA sowie der 23S und 16S rRNA von *S. aureus* und *E. coli* transfiziert. Während die Total-RNA von Gram-negativen wie auch -positiven Bakterien eine lediglich verminderte TNF-Freisetzung induziert, war ein stimulierender Effekt der ribosomalen RNAs praktisch nicht nachweisbar (Abbildung 45).

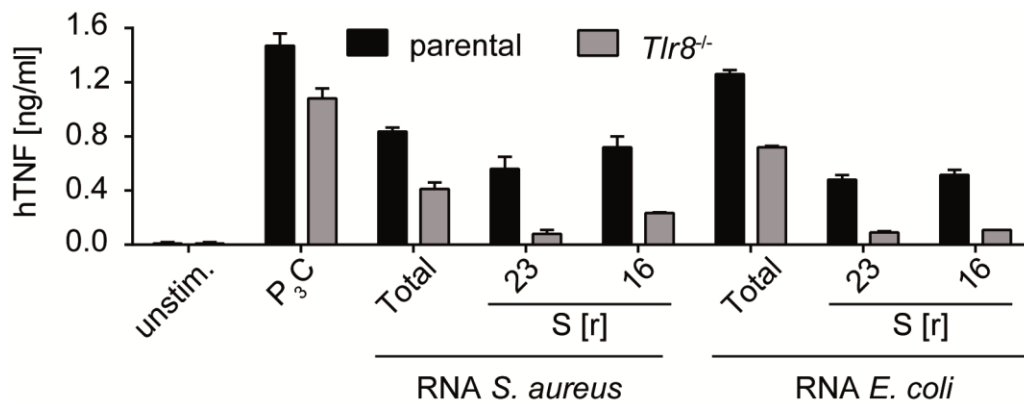


Abbildung 45: TLR8 abhängige Erkennung großer bakterieller ribosomaler RNAs. 3ddi parental und *Tlr8*^{-/-} THP-1 Zellen wurden mit Pam₃CSK₄ (P₃C) stimuliert und mit der Total-RNA (1 µg), 23S und 16S rRNA (600 ng) von *S. aureus* (Sa) sowie *E. coli* (Ec) für 16 h transfiziert. Der TNF Gehalt im Überstand wurde via ELISA analysiert.

Um TLR8 als Sensor bakterieller sowie mitochondrieller RNA in hPBMC zu bestätigen, wandte ich T8i an. Dieses inhibitorische ODN reduzierte dosisabhängig die Immunantwort von hPBMC auf BtmtD3_4, während die Stimulation von Pam₃CSK₄ nicht beeinflusst wurde (Abbildung 46). T8i alleine hatte keinen messbaren Effekt auf die Zellen.

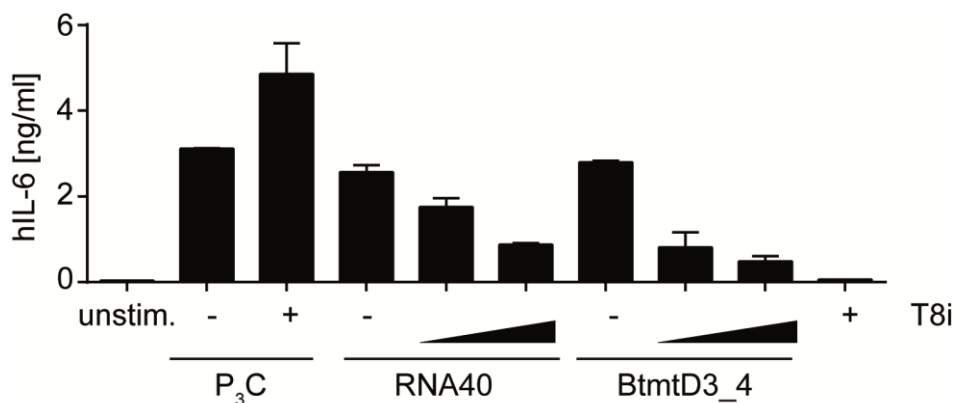


Abbildung 46: T8i hemmt dosisabhängig die Responsivität von PBMC auf die mtrRNA. PBMC wurden für 30 min mit dem inhibitorischen ODN T8i vorinkubiert (1 und 3 µM) und anschließend mit Pam₃CSK₄ (P₃C, 1 µg/ml), RNA40 (0,5 µg/ml) und BtmtD3_4 (0,5 pmol) stimuliert. Der Überstand wurde nach 24 h auf seinen Zytokin Gehalt hin untersucht. + , - mit und ohne T8i.

Wir konnten zeigen, dass TLR8 nicht nur durch bakterielle sondern auch durch mitochondrielle RNAs aktiviert wird. Laut Literatur erkennt TLR8 eine Uridin (U) abhängige virale ssRNA (Heil et al. 2004). Konsequenterweise untersuchten wir daraufhin das Aktivierungspotential der Sa12 Variante ohne U im Vergleich mit Sa12s6U, dessen A an Position 6 durch ein U ausgetauscht wurde (Tabelle 15). Weder TLR8 überexprimierende HEK293 (Abbildung 47 A) noch hPBMC (Abbildung 47 B) reagierten auf die U-lose Sa12 Variante, während Sa12s6U in beiden eine deutliche Stimulation induzierten. Auf die Sa12 Variante, die anstelle des U ein G enthält „Sa12s6G“ reagierten die PBMCs ebenfalls nicht.

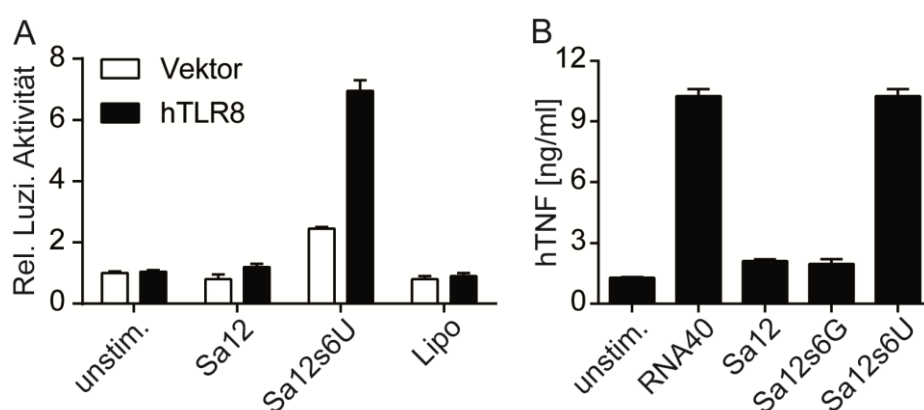


Abbildung 47: Uridin-abhängige Aktivierung von TLR8. (A) HEK293 Zellen wurden mit dem Leervektor (Vektor) sowie TLR8 (15 ng) mit einem NF κ B Promotorkonstrukt überexprimiert. Die ORN Sa12, Sa12s6U wurden mit Lipofectamin 2000 (Lipo) transfiziert. (B) PBMC wurden mit den ORN RNA40 (0,5 μ g/ml) und Sa12, Sa12s6G sowie Sa12s6U transfiziert. Von den ORN wurden jeweils 0,5 pmol appliziert.

3.2.4 Rolle von TLR8 und TLR2/4 bei bakteriellen Infektionen

Um die Frage zu beantworten, ob die Stimulation von Immunzellen durch hitzeinaktivierten *E. coli* bzw. dessen RNA über TLR8 erfolgt, behandelten wir eine Suspension des Gram-negativen Bakterium mit RNase A und applizierten das resultierende Präparat auf parentale, *Tlr8*^{-/-} und *Unc93b1*^{-/-} 3ddi THP-1 Zellen für 16 h. Die Responsivität der Zellen wurde durch den Stimulus Pam₃CSK₄ nachgewiesen, der in Zellen aller drei Genotypen die Produktion ähnlicher Mengen an TNF induzierte (Abbildung 48). RNA40 hingegen löste lediglich in den parental Zellen die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine aus. Der RNase A Verdau von

hitzeinaktivierter *E. coli* Suspension verringerte dosisabhängig von der eingesetzten Bakterienkonzentration den stimulativen Effekt in den parentalen Zellen. *Tlr8*^{-/-} und *Unc93b1*^{-/-} THP-1 Zellen induzierten bereits bei Konfrontation mit Bakterien einer Konzentration von 10⁶ cfu/ml eine signifikant geringere Menge an TNF, dessen Produktion durch den RNase A Verdau komplett inhibiert wurde.

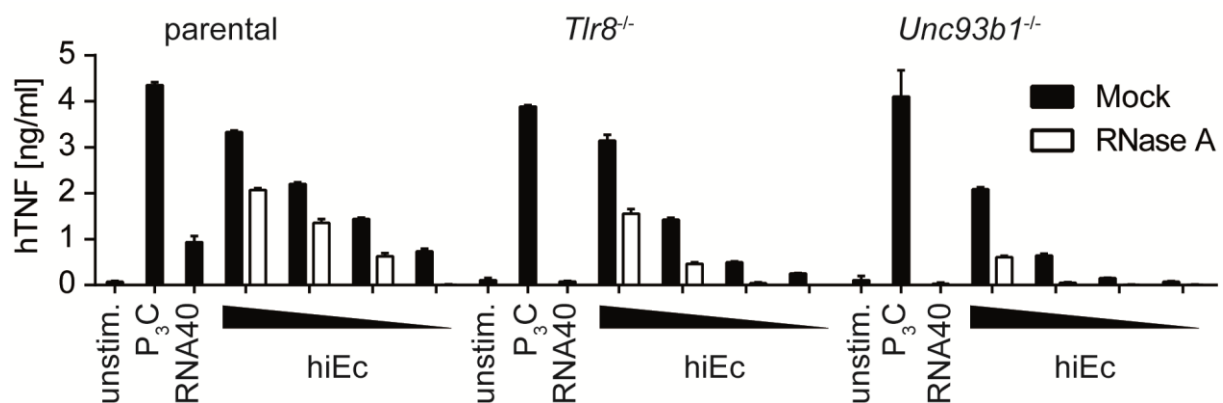


Abbildung 48: RNase A abhängige hiEc Erkennung. Parentale, *Tlr8*^{-/-} und *Unc93B1*^{-/-} 3ddi THP-1 Zellen wurden mit Pam₃CSK₄ (P₃C, 1 µg/ml) und RNA40 (0,5 µg/ml) stimuliert. Hitzeinaktivierter *E. coli* (hiEc, 10⁷, 10⁶, 10⁵, 10⁴ cfu/ml) wurde mit oder ohne RNase A (20 µg/µl, 1 h für 37°C) inkubiert und auf die Zellen appliziert. Die TNF Induktion wurde nach 16 h via ELISA bestimmt.

Weil eine Blockade von TLR2 zusammen mit TLR4 Mäuse vor einem durch Gram-negative Bakterien ausgelösten septischen Schock schützte, stellte ich die Frage, ob die simultane Blockade von TLR2 und TLR8 Immunzellen des Menschen in ihrer Reaktivität auf eine bakterielle Infektion signifikant hemmt (Spiller et al. 2008). Zu diesem Zweck wurde der kreuzreaktive anti-TLR2 monoklonale Antikörper T2.5 eingesetzt, der TLR2 blockiert. Um das Wirkungsoptimum von T2.5 zu bestimmen, wurden parentale THP-1 Zellen für 30 min mit 25 und 50 µg/ml T2.5 Antikörper inkubiert und anschließend mit Pam₃CSK₄ oder Pam₂CSK₄ konfrontiert (Abbildung 49 A). Um einen inhibitorischen Effekt von T2.5 darzustellen, wurden die Überstände jeweils nach 8 oder 24 h auf ihren Zytokinengehalt hin untersucht. Konsequenterweise wurden auch die humanen PBMCs dieser Kontrolle unterzogen, aber mit hiSa statt Pam₃CSK₄, was für die Folgeexperimente essentiell war (Abbildung 49 B). In Überständen beider Zelltypen war die Zytokinkonzentration nach 24 h signifikant höher als nach 8 h. Die Reduktion des stimulativen Effekts von

Pam₃CSK₄ sowie hiSa war ebenfalls nach 24 h stärker. Die Inhibition von Pam₃CSK₄ fiel gegenüber jener von Pam₂CSK₄ deutlicher aus, weshalb ersteres für die weiteren Versuche als Positivkontrolle verwendet wurde. Da kein Unterschied der Inhibition zwischen der niedrigeren und größeren Menge von T2.5 zu erkennen war, wurde die niedrigere Dosis in den Folgeexperimenten eingesetzt.

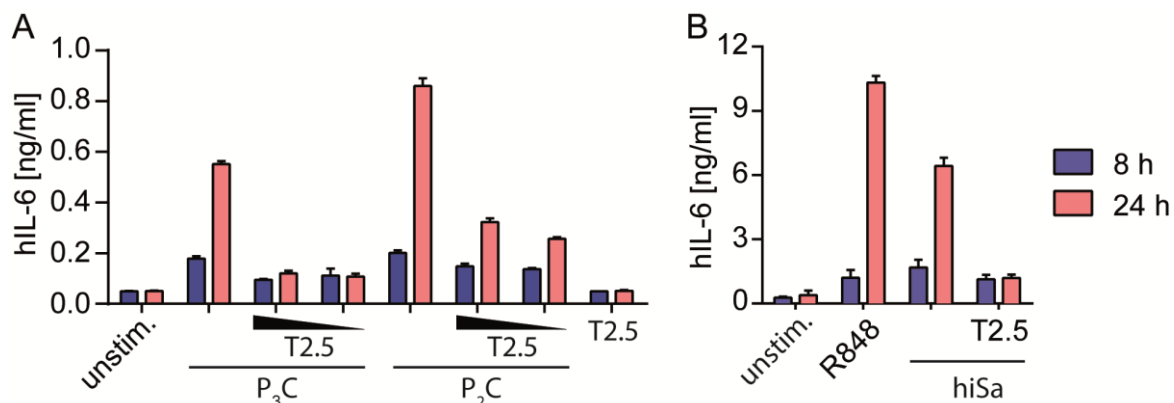


Abbildung 49: T2.5 Effekt im Vergleich nach 8 und 24 h Inkubation. (A) 3ddi parentale THP-1 Zellen wurden mit dem TLR2 neutralisierenden mAb (T2.5) mit 25, 50 µg/ml für 30 min inkubiert und anschließend mit Pam₃CSK₄ und Pam₂CSK₄ (je 1 µg/ml) stimuliert. (B) Die PBMC wurden mit und ohne T2.5 (25 µg/ml) Behandlung mit R848 (5 µg/ml) und mit hitzeinaktivierten *S. aureus* (hiSa, 10⁷ cfu/ml) konfrontiert. (A, B) Die Zellüberstände wurden nach 8 und 24 h auf ihren IL-6 Gehalt mittels ELISA untersucht.

Zunächst wurden *Tlr8*^{-/-} und *Unc93B1*^{-/-} THP-1 Zellen mit und ohne TLR2 Antikörper inkubiert und anschließend mit Pam₃CSK₄ sowie hitzeinaktivierten *S. aureus* und *E. coli* konfrontiert (Abbildung 50). In den *Unc93B1* defizienten Zellen führt die T2.5 Vorinkubation zu einer signifikanten Reduktion der Zytokinfreisetzung auf die Applikation von hiEc hin, während die Erkennung von hiSa komplett blockiert wurde (Abbildung 50 A). Auch in *Tlr8*^{-/-} THP-1 Zellen führte die Gabe von T2.5 zur kompletten Unterdrückung der Immunstimulation mit hiSa und zu einer signifikanten Reduktion nach Inkubation mit hiEc (Abbildung 50 B).

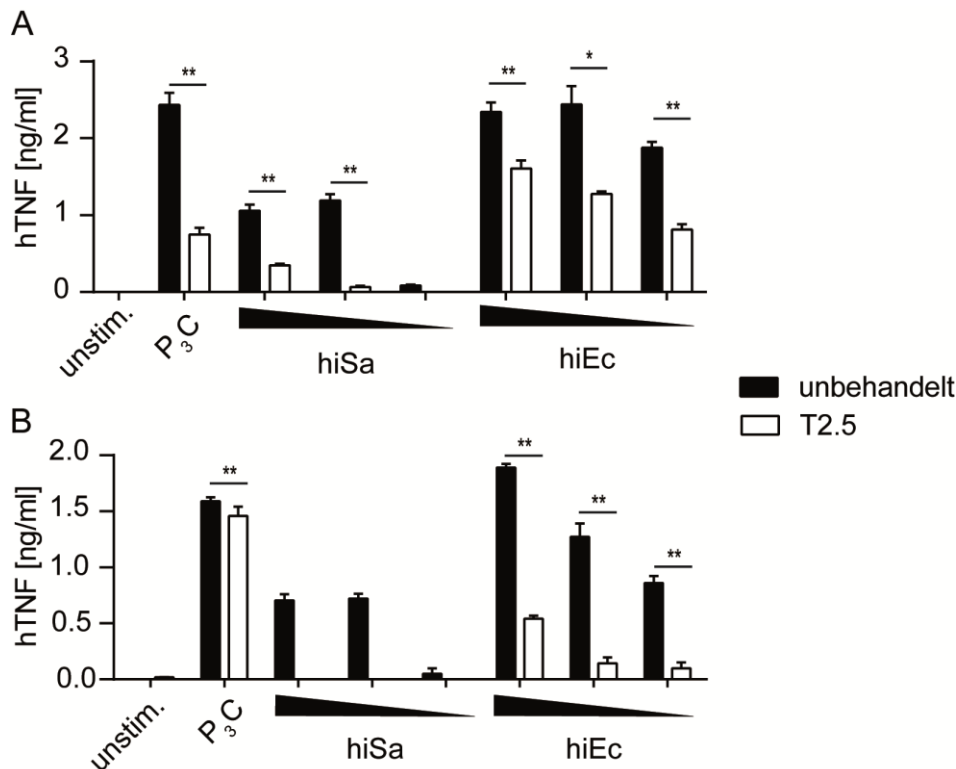


Abbildung 50: In 3ddi *Tlr8*^{-/-} und *Unc93B1*^{-/-} THP-1 Zellen führt die TLR2 Blockade zur kompletten Hemmung der Immunantwort. 3ddi (A) *Tlr8*^{-/-} und (B) *Unc93B1*^{-/-} THP-1 Zellen wurden mit und ohne T2.5 (20 µg/ml) für 30 min vorinkubiert und anschließend mit Pam₃CSK₄ (P₃C, 1 µg/ml) und hitzeinaktivierten (hi) *S. aureus* (Sa) oder *E. coli* (Ec, je 10⁸, 10⁷, 10⁶ cfu/ml) konfrontiert. Der Überstand wurde per ELISA auf seinen Zytokingehalt hin untersucht.

Anschließend wurden die Immunantworten von hPBMCs auf hitzeinaktivierten *S. aureus* und *E. coli* mit und ohne Blockierung der endosomalen TLR und TLR2 analysiert. Die Zellen wurden wie beschrieben mit den inhibierenden Substanzen, die separat und auch koappliziert wurden, konfrontiert und die Zytokininduktion nach 24 h analysiert. Als Positivkontrolle für den T2.5 Antikörper wurde LPS sowie Pam₃CSK₄ verwendet. Die TNF-Freisetzung war nach Einzel- und Koapplikation deutlich gehemmt (Abbildung 51). Zur Kontrolle der endosomalen Hemmung wurde RNA40 sowie BtmtD3_4 transfiziert, die nach Vorinkubation mit Chloroquin keine proinflammatorischen Zytokine mehr induzierten. Die Erkennung hitzeinaktivierter Bakterien wurde durch die Hemmung der endosomalen TLR signifikant blockiert, wohingegen die simultane Hemmung in der niedrigen Dosis bei *S. aureus* (Abbildung 51 A) und bereits mit der höchsten Dosis *E. coli* (Abbildung 51 B) die Zytokinaktivität

blockiert. Diese Ergebnisse untermauern die Hypothese, dass eine Blockierung von TLR8 zusammen mit TLR2 vor einer durch Bakterien induzierten Sepsis schützen könnte.

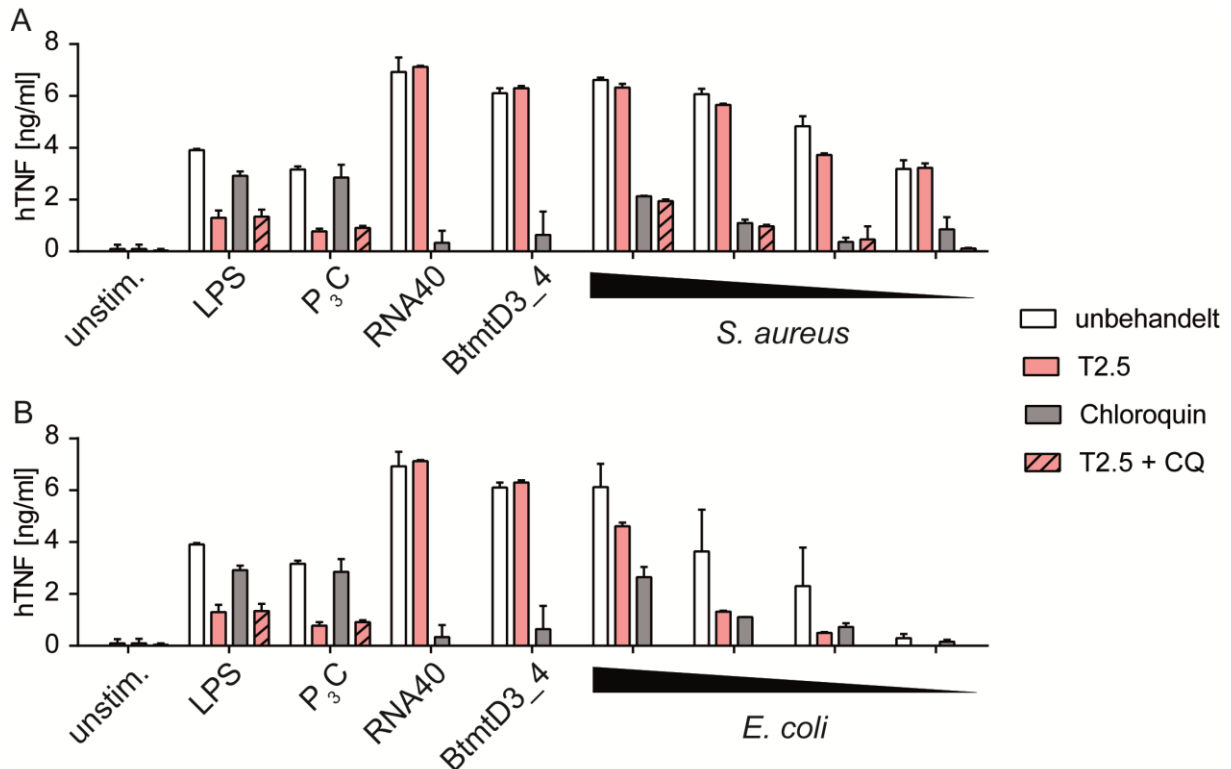


Abbildung 51: Inhibition durch Chloroquin in PBMC hemmt Zytokinproduktion effektiver als durch T2.5 nach Konfrontation mit lebenden Bakterien. PBMCs wurden mit T2.5 (20 µg/ml), Chloroquin (5 µg/ml), in Kombination beider Substanzen (T2.5 + CQ, Chloroquin) für 30 min oder 1 h inkubiert. Die Zellen wurden mit LPS (0,1 µg/ml), Pam₃CSK₄ (P₃C, 1 µg/ml), RNA40 (0,5 µg/ml), BtmtD3_4 (0,5 pmol) konfrontiert. Viable Bakterien (A) *S. aureus* (1x10⁶, 5x10⁵, 1x10⁵, 1x10⁴ cfu/ml) und (B) *E. coli* (5x10⁵, 1x10⁴, 5x10³, 1x10³ cfu/ml) wurden nach 1 h mit Gentamicin (10 µg/ml) abgetötet, um ein Überwachsen zu verhindern. Nach weiteren 23 h wurde der TNF Gehalt im Überstand untersucht.

3.3 Die Rolle von RIG-I in der Erkennung bakterieller RNA

Auf der Suche nach Rezeptoren für bakterielle RNA wurde in einem vorangegangenen Projekt die Erkennung von Gram-negativen Bakterien über die RIG-I ähnliche Helikase (RLH, RIG-I like helicase) RIG-I entdeckt. Die im Zytoplasma lokalisierte Rezeptoren MDA5 und RIG-I gehören zur Familie der RLH und sind

bekannt als virale RNA Sensoren. In diesem Teil der Arbeit untersuchte ich die Reproduzierbarkeit der bereits erhobenen Daten und analysierte die Hypothese, dass RIG-I neben viraler auch bakterielle RNA erkennt. RIG-I und MDA5 wurden dazu in HEK293 Zellen überexprimiert und mit hitzeinaktivierten Gram-negativen (*Escherichia coli*, *Salmonella enterica*) und Gram-positiven Bakterien (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*) inkubiert. Die Aktivierung der Zellen wurde mittels eines IFN β -Promotor getriebenen Luziferasereportergens bestimmt. Lediglich die Gram-negativen Bakterien, namentlich *E. coli* und *S. enterica*, induzierten eine signifikante Luziferaseaktivität, während Gram-positive Bakterien weder über RIG-I noch über MDA5 erkannt wurden (Abbildung 52). Diese Ergebnisse bestätigten die Aktivierung von RIG-I aber nicht MDA5 durch Gram-negative Bakterien.

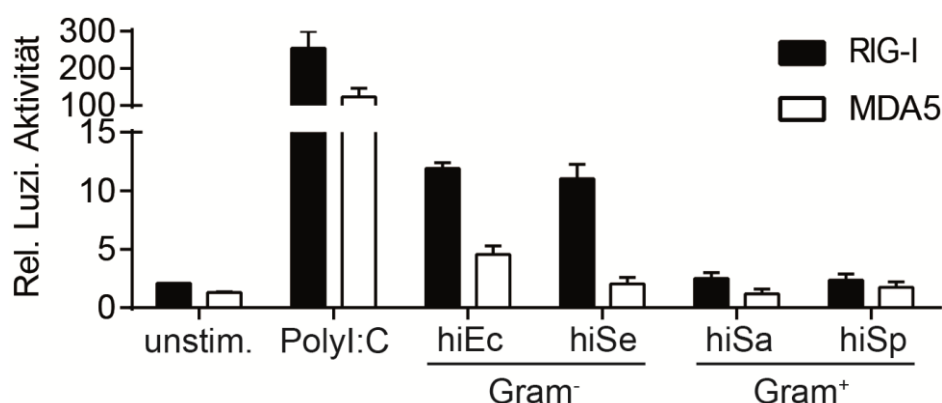


Abbildung 52: Gram-negative Bakterien aktivieren RIG-I aber nicht MDA-5. HEK293 Zellen wurden mit Plasmiden kodierend für RIG-I (1 ng) oder MDA5 (2 ng) sowie einem IFN β getriebenen Luziferasepromotorkonstrukt für 16 h transfiziert. 10^7 cfu/ml hitzeinaktivierte (hi) Gram-negative (Gram⁻), *E. coli* (Ec) sowie *S. enterica* (Se) und Gram-positive (Gram⁺), *S. aureus* (Sa) sowie *S. pneumoniae* (Sp) wurden für weitere 16 h auf die Zellen appliziert. 20 μ g/ml PolyI:C diente zur Demonstration der Aktivierbarkeit von RIG-I und MDA5. Die relative Luziferaseaktivität (Rel. Luzi. Aktivität) des Zelllysats wurde anschließend gemessen.

3.3.1 Gram-negativ bakterielle RNA wird über RIG-I erkannt

Nachdem ich bestätigt hatte, dass RIG-I Gram-negative Bakterien erkennt, untersuchte ich die bakterielle RNA als aktivierendes Motiv genauer, da RIG-I kurze einzelsträngige (ss) RNA der meisten Viren erkennt. Um seine Eigenschaft als

bakteriellen RNA Rezeptor näher zu charakterisieren, wurde die RNA verschiedener Bakterien isoliert und auf ihre aktivierende Wirkung hin untersucht. Während die Total-RNAs von *E. coli* oder *Moraxella catharralis* eine dosisabhängige Luziferaseaktivität induzierten, stimulierte die Total-RNA von Gram-positiven Bakterien, namentlich *S. aureus* und *Listeria monocytogenes*, nicht (Abbildung 53). Interessanterweise führte die geringere Konzentration der Total-RNA Gram-negativer Bakterien zu einer deutlich stärkeren Luziferaseaktivität. Diese Ergebnisse implizierten RIG-I als Sensor für Gram-negativ bakterielle RNA.

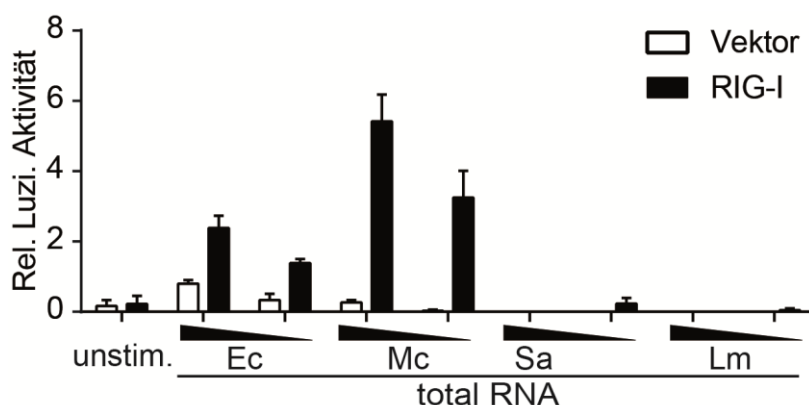


Abbildung 53: RIG-I als Sensor für Gram-negativ bakterielle Total-RNA. Der Leervektor (Vektor) und ein RIG-I Expressionsvektor (2,5 ng) wurden zusammen mit dem IFN β -Promotorkonstrukt in HEK293 Zellen transfiziert. Anschließend wurden die Zellen mit der Total-RNA der verschiedenen Bakterien konfrontiert. 200 und 600 ng Total RNA von *E. coli* (Ec) sowie 200 und 400 ng von *M. catarrhalis* (Mc), *S. aureus* (Sa), *L. monocytogenes* (Lm) wurde mit dem Transfektionsreagenz LyoVec appliziert. Nach 16 h Inkubation wurde die IFN β -Induktion per Reportergenassay analysiert.

Im Folgenden engte ich die aktivierende Fraktion der bakteriellen RNA ein. Konsequenterweise wurden die RNA Subspezies von Gram-negativen und zur Kontrolle auch von Gram-positiven Bakterien isoliert, um sie auf ihre stimulative Kapazität hin zu testen. Die Total-RNA, die 23S und 16S rRNA, sowie die in der kleinen Fraktion enthaltenen 5S rRNA und tRNA wurden in RIG-I überexprimierenden HEK293 transfiziert. Die Total-RNA und die Fraktion der kleinen RNAs von *H. influenzae* aktivierten RIG-I (Abbildung 54 A). Die großen ribosomalen RNAs, namentlich 23S und 16S sowie die Total-RNA und die Fraktionen von *S. aureus* induzierten hingegen keine Luziferaseaktivität. Um die Fraktion mit dem

aktivierenden Motiv einzugrenzen, wurde die Total-RNA mit einer Exonuklease (*Terminator™ 5'-Phosphate- Dependent Exonuclease*) oder einer Polyphosphatase (RNA 5' Polyphosphatase) inkubiert. Die Exonuklease erkennt 5'-Monophosphate und baut die ribosomalen RNAs ab, um mRNA anzureichern. Der Verdau der Total-RNA mit der Exonuklease hatte keinen Einfluss auf die RIG-I Aktivität (Abbildung 54 B). Die Polyphosphatase hingegen hinterlässt Monophosphate am 5'-Terminus der mRNA, indem sie Diphosphate abspaltet, um die Degradation durch RNase E vorzubereiten. Dieser Mechanismus dient dem mRNA Abbau, der ein 5'-Monophosphat benötigt. Der Abbau von Triphosphaten am 5'-Terminus der Total-RNA durch die Polyphosphatase korrelierte mit einer Abwesenheit von Luziferaseaktivität. Diese Ergebnisse identifizierten die Fraktion der kleinen RNAs, 5S rRNA und tRNA enthaltend, als RIG-I aktivierende Fraktion. Der Verlust der Responsivität nach Verdau mit der Polyphosphatase impliziert einen essentiellen Einfluss der Polyphosphorylierung am 5'-Terminus der RNA auf die Rezeptorerkennung.

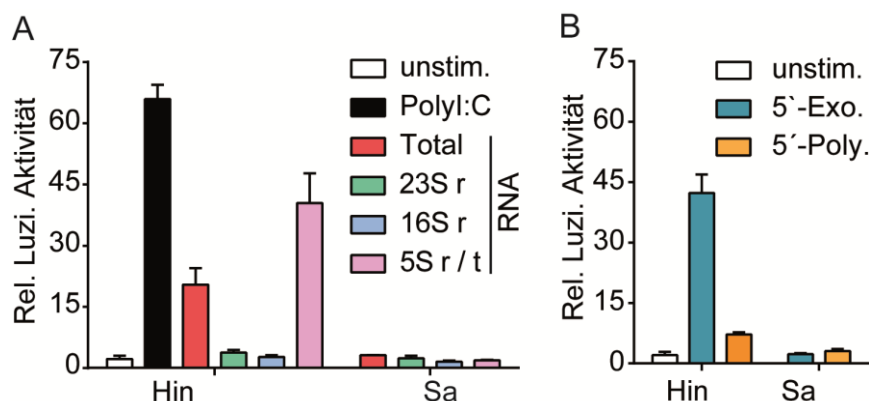


Abbildung 54: Total RNA sowie die niedermolekulare Fraktion der Gram-negativen Bakterien aktiviert RIG-I. HEK293 Zellen wurden mit 2,5 ng RIG-I Expressionsplasmid zusammen mit dem IFN β -Promotorkonstrukt Plasmid transfiziert und mit RNA von *H. influenzae* (Hin) und *S. aureus* (Sa) konfrontiert. (A) Unstimulierte (unstim.) Zellen wurden ebenso auf ihre Luziferaseaktivität hin analysiert wie Zellen, die mit PolyI:C (2,5 μ g/ml), Total-RNA (400 ng), 23S und 16S ribosomale (r) RNA (200 ng) und der Fraktion mit den kleinen RNAs (5S rRNA, tRNA, 200 ng) konfrontiert wurden. (B) Die Total-RNA (400 ng) wurde mit einer Exonuklease (Exo) und einer Polyphosphatase (Poly) vorbehandelt und anschließend zu den RIG-I überexprimierenden Zellen appliziert, um die Luziferaseaktivität zu messen.

3.3.2 Identifizierung der RIG-I aktivierenden RNA Subspezies

Zur weiteren Charakterisierung der stimulativen RNA Subspezies wurde die RIG-I stimulierende Fraktion der kleinen RNAs durch Anne Krüger weiter in die 5S rRNA und tRNA aufgetrennt und präpariert. Die tRNA von *H. influenzae* aber nicht die 5S rRNA induzierte eine substanzielle Luziferaseaktivität in RIG-I überexprimierenden HEK293 Zellen (Abbildung 55 A). Der Überstand der HEK293 Zellen wurde simultan auf Freisetzung von hIL-8 via ELISA analysiert. Auch hier induzierte lediglich die Total-RNA und die tRNA eine Zytokinfreisetzung, nicht aber die 5S rRNA (Abbildung 55 B). Diese Ergebnisse identifizierten die tRNA als RIG-I aktivierende RNA Fraktion.

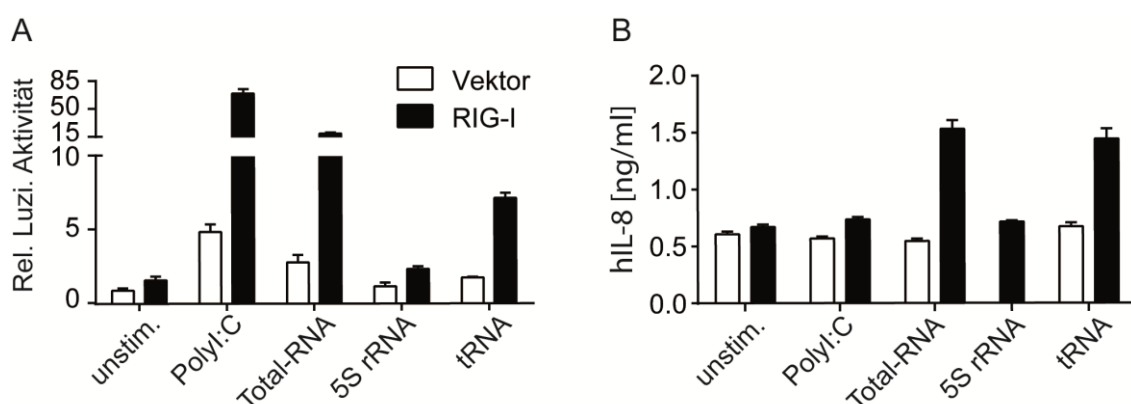


Abbildung 55: Die tRNA von Gram-negativen Bakterien ist die stimulierende RNA Fraktion. RIG-I (2,5 ng) überexprimierende HEK293 Zellen wurden mit PolyI:C (10 µg/ml) sowie mit den RNA Fraktionen (400 ng Total-RNA, 100 ng 5S rRNA und 50 ng tRNA) für 16 h inkubiert. (A) Das Lysat wurde auf die Aktivierung der IFN β -Promotor getriebenen Luziferaseaktivität (Rel. Luzi. Aktivität) hin analysiert und (B) der Überstand auf seinen Zytokingehalt hin untersucht.

Zur Bestätigung des Befundes, dass lediglich Gram-negative tRNA von RIG-I erkannt wird, wurden die RNA Fraktionen von *S. aureus* aufgereinigt und in RIG-I überexprimierenden HEK293 transfiziert. Weder die 5S rRNA noch die tRNA induzierten eine messbare Luziferaseaktivität (Abbildung 56).

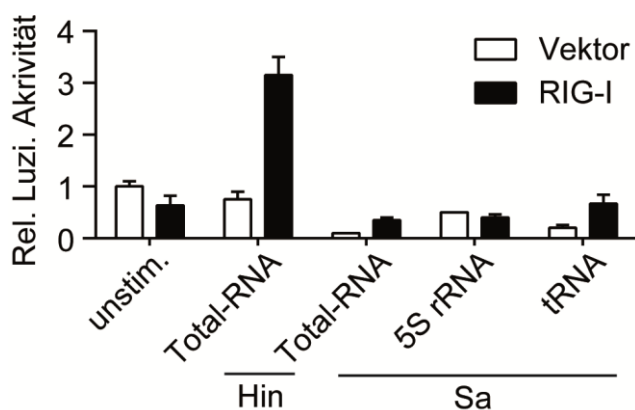


Abbildung 56: Gram-positiv bakterielle RNA wird nicht über RIG-I erkannt. HEK293 Zellen transfiziert mit einem RIG-I Expressionsplasmid (2,5 ng) und dem Luziferase kodierenden IFN β -Promotorkonstrukt wurden mit der Total-RNA (400 ng) von *H. influenzae* (Hin) sowie der Total-RNA (400 ng), 5S rRNA (100 ng) und tRNA (50 ng) von *S. aureus* (Sa) konfrontiert. Die IFN β -Promotor getriebene Luziferaseaktivität wurde nach 16 h untersucht.

Um die RIG-I abhängige Stimulativität der Gram-negativ bakteriellen RNA zu festigen, wurde das System der Überexpression von Promotor getriebenen IFN β und RIG-I in HEK293 auf primäre Zellen erweitert. Dazu wurden wt und Unc93B1 defekte (3D) primäre Makrophagen mit den Positivkontrollen PolyI:C und einer am 5-Terminus triphosphorylierten RNA (pppRNA) sowie der Total-RNA, 5S rRNA und tRNA von *M. catarrhalis* konfrontiert. Die Kulturüberstände wurden auf ISRE-Zellen appliziert, einer Zelllinie, die ein durch Typ-I Interferone induzierbares Luziferase-Reporter Konstrukt (ISRE) exprimiert. Durch die über RIG-I induzierten und sekretierten Typ-I Interferone im Überstand der Makrophagen wurde eine Luziferaseaktivität in den ISRE-Zellen gemessen. Sowohl die wt als auch die 3D Makrophagen wiesen eine ähnliche Luziferaseaktivität nach Konfrontation mit der tRNA von *M. catarrhalis* auf (Abbildung 57). Dieser Befund schließt die Erkennung der Gram-negativen bakteriellen tRNA durch endosomale TLR aus, da trotz defektem Chaperon Unc93b eine durch Typ-I Promotor induzierte Luziferaseaktivität nachgewiesen wurde.

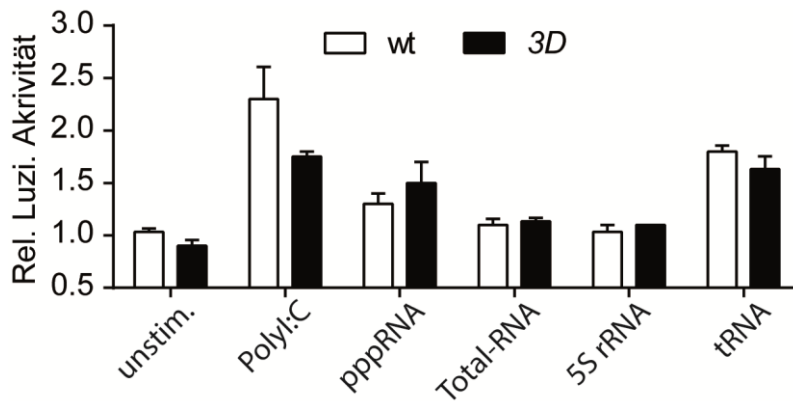


Abbildung 57: Die Erkennung bakterieller Gram-negativer tRNA ist unabhängig von endosomalen TLRs. Wildtyp (wt) sowie Unc93B inaktive (3D) Makrophagen wurden mit PolyI:C (10 µg/ml), pppRNA (200 ng), der Total-RNA (400 ng), 5S rRNA und tRNA (200 ng) von *M. catarrhalis* für 16 h inkubiert. Der Überstand wurde auf die ISRE-Promotor Zellen überführt und die durch Typ-I Interferon induzierte Luziferaseaktivität (Rel. Luzi. Aktivität) gemessen.

3.3.3 Charakterisierung der tRNA als stimulatives Motiv

Die bisherigen Ergebnisse implizierten 5'-phosphorylierte RNA Gram-negativer Bakterien als RIG-I stimulierendes Motiv. Dies konnte nach Auftrennung der Fraktion auf die tRNA eingegrenzt werden. 2006 wurde beschrieben, dass RIG-I 5'-triphosphorylierte virale RNA erkennt (Hornung et al. 2006). Daraus resultierend untersuchte ich die 5'-Phosphorylierung der bakteriellen RNA auf ihre RIG-I aktivierende Kapazität. Dazu nutzte ich die Eigenschaft der Phosphatasen RppH (RNA-Pyrophosphohydrolase) und Ciap (*calf intestinal alkaline phosphatase*). Beide Enzyme katalysieren die hydrolytische Abspaltung von Pyrophosphaten am 5'-Terminus der RNA (Abbildung 58).

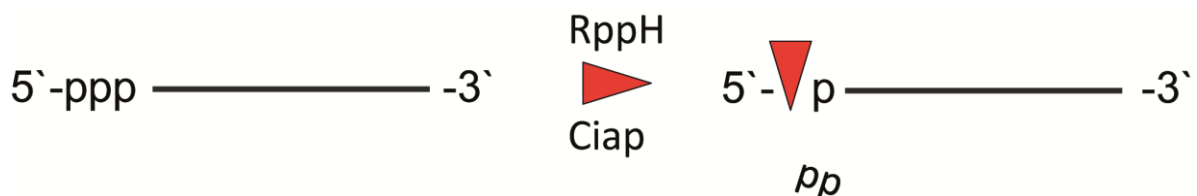


Abbildung 58: RppH und Ciap hydrolysieren 5'-Pyrophosphate der RNA. Die Pyrophosphohydrolase (RppH) sowie die *calf intestinal alkaline phosphatase* (Ciap) katalysieren

die Hydrolyse der Polyphosphorylierungen am 5'-Terminus der RNA und hinterlassen ein Monophosphat.

Zur Kontrolle der katalytischen Eigenschaft der Phosphatasen wurde ein synthetischer RIG-I Ligand, 5'ppp-dsRNA (pppRNA), mit den Enzymen inkubiert und anschließend in RIG-I überexprimierende HEK293 Zellen transfiziert. Die am 5'-Terminus triphosphorylierte dsRNA induzierte eine deutliche Luziferaseaktivität, wohingegen eine Abspaltung der Triphosphate diese inhibierte (Abbildung 59).

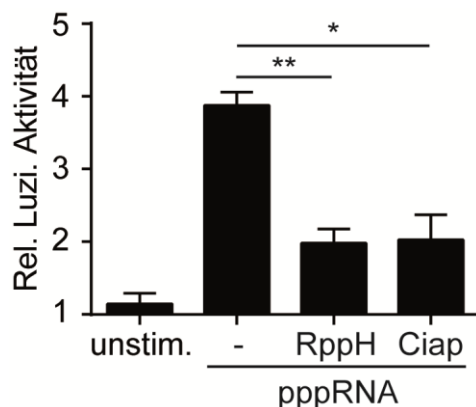


Abbildung 59: Die Dephosphorylierung von pppRNA hebt ihren RIG-I stimulativen Effekt auf. Eine synthetisches Oligonukleotid mit einem Triphosphat am 5'-Terminus wurde mit der Pyrophosphohydrolase (RppH) oder der *calf intestinal alkaline phosphatase* (Ciap) für je 1 h bei 37°C inkubiert. 200 ng der un- sowie mit RppH und Ciap behandelten RNA wurden in RIG-I überexprimierenden HEK293 Zellen transfiziert und die über IFN β -Promotor induzierte Luziferaseaktivität analysiert.

Nach Kontrolle der effektiven Dephosphorylierung wurde sowohl die Total-RNA sowie auch die tRNA von *H. influenzae* mit RppH und Ciap behandelt. Während die Hydrolyse der Total-RNA von *H. influenzae* mit RppH die Aktivierung signifikant reduzierte, führte sie bei der tRNA zur kompletten Inhibition der Erkennung durch RIG-I (Abbildung 60 A). Dieser Effekt wurde ebenfalls mit der Phosphatase Ciap erzielt. Ciap verdaute Total- und tRNA induzierten eine signifikant geringere Luziferaseaktivität im Vergleich zu unbehandelten RNAs. Ciap alleine oder in Kombination mit PolyI:C hatte keinen Effekt (Abbildung 60 B). Diese Ergebnisse identifizierten das polyphosphorylierte 5'-Ende der tRNA als RIG-I aktivierendes Motiv in Gram-negativen Bakterien.

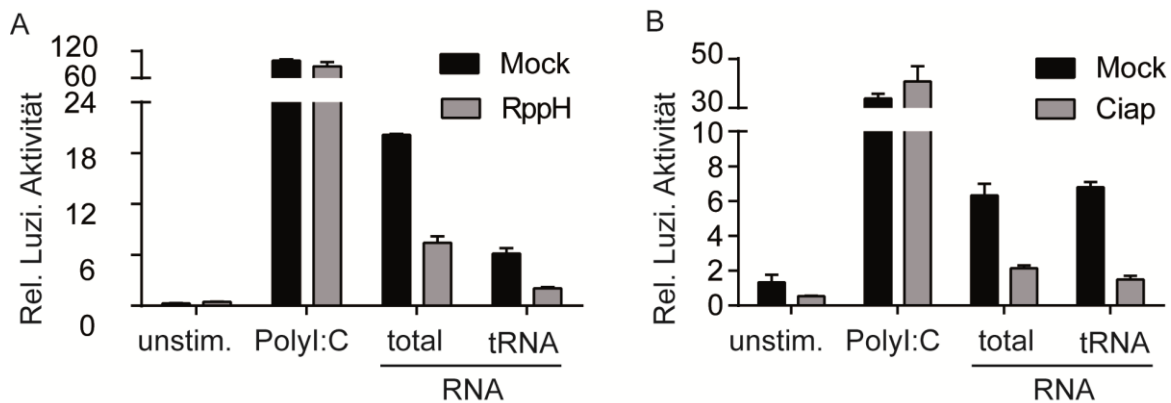


Abbildung 60: Triphosphorylierte tRNA stimuliert RIG-I. HEK293 Zellen, transfiziert mit 2,5 ng RIG-I Expressionsplasmid sowie dem IFN β -Promotor getriebenen Luziferasereporter Plasmid, wurden mit PolyI:C (10 μ g/ml), Total-RNA (400 ng) und tRNA (150 ng) von *H. influenzae* konfrontiert. Sowohl PolyI:C wie auch die RNAs blieben unverdaut (Mock) oder wurden für 1 h bei 37° mit der Polyphosphatase (A) RppH oder (B) Ciap inkubiert und zu den Zellen appliziert. Die Aktivierung wurde anhand der durch den IFN β -Promotor induzierten Luziferasemenge bzw. -aktivität (Rel. Luzi. Aktivität) gemessen.

3.3.4 Abhängigkeit von IPS-1 in der RIG-I Signalkaskade

Nach Charakterisierung der RIG-I stimulierenden Triphosphorylierung am 5'-Terminus der Gram-negativ bakteriellen tRNA untersuchte ich den durch diese Aktivierung eingeleiteten Signalweg. RIG-I rekrutiert das Adapterprotein IPS-1/MAVS, um die Phosphorylierung von IRF3 und damit dessen Kerntranslokation einzuleiten und schließlich die Expression von Typ-I Interferonen zu induzieren. Zur Analyse der Involvierung von IPS-1 in die Erkennung von Gram-negativ bakterieller RNA wurden Überstände von Makrophagen auf die ISRE-Zellen appliziert und die Induktion ihrer Luziferaseaktivität gemessen. Wt und *IPS-1*^{-/-} Makrophagen wurden mit der Total-RNA von *E. coli* und *H. influenzae* sowie der tRNA von *E. coli* transfiziert. Während die Total-RNA sowie die tRNA Gram-negativer Bakterien in den Überständen von wt Makrophagen eine Luziferaseaktivität auslöste, wurde sie in den *IPS-1*^{-/-} Überständen signifikant blockiert (Abbildung 61 A). Der Verlust von IPS-1 hatte auf die stimulative Eigenschaft Gram-positiv bakterieller RNA, hier *Listeria monocytogenes*, keinen Einfluss (Abbildung 61 B). Weitere Experimente sind notwendig, um die Abhängigkeit von IPS-1 in der durch RIG-I induzierten Signalkette zu untermauern.

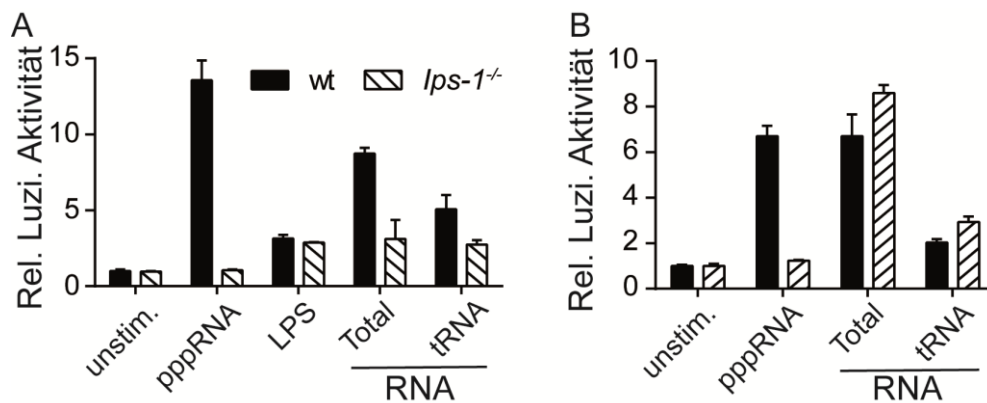


Abbildung 61: Gram-negative RNA induziert über RIG-I Typ-I Interferon. Wildtyp (wt) und *Ips-1*^{-/-} Makrophagen wurden unstimuliert (unstim.) oder mit pppRNA (200 ng), LPS (1 µg/ml) oder der Total- (400 ng) und tRNA (200 ng) von (A) *E. coli* und (B) *L. monocytogenes* konfrontiert. Nach 16 h wurde der Überstand auf ISRE-Zellen appliziert und die durch Typ-I Interferon-Promotor aktivierte Luziferaseaktivität (Rel. Luzi. Aktivität) gemessen.

In einem ersten Pilotexperiment wurde die RIG-I Aktivierung durch Western-Blot-Analyse der induzierten Proteine untersucht. Auf die Aktivierung von RIG-I hin wird IRF3 phosphoryliert, welches die Expression der Typ-I Interferone vermittelt. Primäre Makrophagen wurden mit dem endosomalen Inhibitor Chloroquin vorinkubiert und anschließend mit PolyI:C, der Total-RNA sowie der 5S rRNA und tRNA transfiziert. PolyI:C, die Total-RNA und auch die tRNA induzierten IRF3 Phosphorylierung (Abbildung 62). Die RIG-I Aktivierung durch PolyI:C wie auch durch die Gram-negativ bakterielle Total-RNA und tRNA führt demnach über eine IRF3 Phosphorylierung zur Produktion von Typ-I Interferonen.

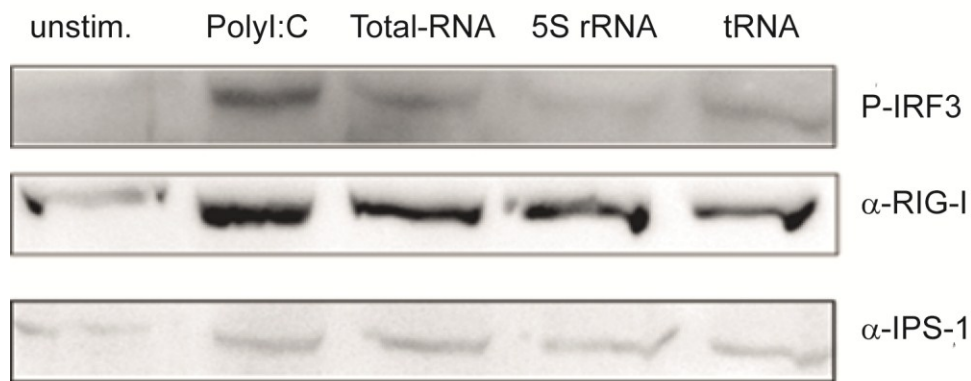


Abbildung 62: RIG-I induziert Phosphorylierung von IRF3 nach Inkubation mit Total und tRNA. Wildtyp Makrophagen wurden 1 h mit Chloroquin (5 µg/ml) vorbehandelt und anschließend für 16 h mit PolyI:C (20 µg/ml), Total-RNA (1 µg/ml), 5S rRNA (400 ng) und tRNA (400 ng) von *H. influenzae* inkubiert. Die Analyse der Zelllysate erfolgte über Westernblot.

Die RIG-I Erkennung der Gram-negativ bakteriellen RNA wird meinen Befunden zufolge durch ein pyrophosphoryliertes 5'-Ende der tRNA vermittelt. Die durch RIG-I aktivierte Signalkaskade löst über IPS-1/MAVS Aktivierung eine Phosphorylierung, eine Kerntranslokation des Transkriptionsfaktors IRF3 und die Induktion von Typ-I Interferon-Produktion aus.

Auf der Suche nach bakteriellen RNA Sensoren konnten somit drei Rezeptoren identifiziert werden: der murine TLR13, der spezifisch die 23S rRNA Sequenz nahe des aktiven ribosomalen Zentrums erkennt, hTLR8 als humanes Pendant zu TLR13, der sowohl von allen Gram-negativ wie auch Gram-positiv bakteriellen rRNAs aktiviert wird und, schließlich der bisher lediglich für die Erkennung viraler RNA bekannte Rezeptor RIG-I, der im dritten Teil dieser Arbeit als Sensor für gram-negative triphosphorylierte tRNA beschrieben wurde.

4 Diskussion

4.1 Funktion der endosomalen TLR in der Erkennung Gram-positiver Bakterien

Die meist durch Infektionen mit Bakterien ausgelöste Sepsis stellt ein großes Problem der Medizin dar, wobei durch häufige Antibiotikagabe entwickelte Resistenzen die Behandlung oft zusätzlich erschweren. Durch Gram-negative Bakterien ausgelöste Sepsis ist bereits intensiv untersucht worden und ihre Pathologie wird womöglich hauptsächlich durch die Stimulation von TLR2 und TLR4 induziert. Durch Blockade dieser Hauptrezeptoren wurde ein experimentell ausgelöster septischer Schock in Mäusen verhindert (Spiller et al. 2008). Die Sensoren für Gram-positive Bakterien sind bis auf TLR2 bis dato nicht weitergehend charakterisiert gewesen. TLR2 gilt als der Rezeptor für Gram-positive Bakterien, zu denen *Staphylococcus aureus* gehört, ein Hauptverursacher der Gram-positiv bakteriell induzierten Sepsis (Takeuchi et al. 2000, Yimin et al. 2013). Dieser klinisch relevante Vertreter besiedelt als Kommensale vor allem die Schleimhäute der Nase sowie in geringerem Maße diejenigen des weiblichen Genitaltraktes und des Mundrachenraumes (Peacock et al. 2001, Stockholm et al. 2014). Invasive Infektionen mit *S. aureus* führen zu Abszessen, Sepsis, Pneumonie und Endokarditis (Lowy 1998). Bis dato waren neben TLR2 zytoplasmatischen Mustererkennungsrezeptoren (PRR) als Sensoren Gram-positiver Bakterien impliziert. In einer Studie aus unserer Gruppe war die Relevanz der TLR-Familie als Sensoren Gram-positiver Bakterien zunächst durch die Myd88 abhängige und IL-1 Rezeptor unabhängige Responsivität bestätigt worden (Ferstl 2009, Dissertation) und auf einzelsträngige RNA als Pathogen assoziierte molekulare Muster (PAMP) eingegrenzt (Deshmukh et al. 2011).

Makrophagen mit inaktiven Chaperon Unc93B1 reagierten auf die Konfrontation mit dem hitzeinaktivierten Bakterium *S. aureus* nicht, was die Involvierung eines endosomalen TLR implizierte. Die Inkubation von *S. aureus* mit RNasen aber nicht mit DNasen oder Proteasen hob die aktivierende Wirkung in Makrophagen auf und ließ ebenfalls auf einzelsträngige (ss) RNA als immunstimulatorisches PAMP schließen (Abbildung 6). Durch den Ausschluss der Rezeptoren TLR1, -2, -3, -4, -6, -7 und -9 über die Verwendung von *Tlr23479*^{-/-} Makrophagen schlossen wir eine Invol-

vierung der bekannten Sensoren für Nukleinsäuren, namentlich TLR3 (dsRNA), TLR7 (ssRNA) und TLR9 (CpG DNA), aus (Chi und Flavell 2008). Der murine TLR8 galt zunächst als inaktiv (Forsbach et al. 2008). Weitere Untersuchungen hingegen beschreiben eine Schlüsselfunktion von TLR8 in der TLR7 Aktivierung bzw. Hemmung (Cervantes et al. 2012, Tran et al. 2015). So führt die Abwesenheit von TLR8 zu einer erhöhten TLR7 Expression in Makrophagen, DCs und Monozyten und somit zu einem gesteigerten Risiko, die Autoimmunerkrankung Lupus erythematodes zu entwickeln. Die Überexpression von murinem TLR8 in HEK293 Zellen vermittelte keine Empfindlichkeit für hitzeinaktivierte Staphylokokken oder auf ihre RNA (Abbildung 41).

4.1.1 Bakterielle RNA wird nicht über TLR11 oder 12 erkannt

TLR11 und TLR12 wurden ebenfalls als Sensoren von Gram-positiven Bakterien ausgeschlossen. Ihre Überexpression in HEK293 Zellen vermittelte keine Responsivität für hitzeinaktivierte Gram-positive Bakterien (Abbildung 7). Dass TLR11 Profilin des Protozoen *Toxoplasma gondii* erkennt, wurde 2008 bestätigt (Yarovinsky et al. 2005, Plattner et al. 2008). Bisher wurden drei Modelle zur Erkennung von Profilin über TLR11 und TLR12 beschrieben, wobei die Rezeptoren in Assoziation allein oder in Komplexen Profilinerkennung vermittelnd eine Immunaktivierung auslösen. Das Heterodimer „TLR11 und TLR12“ Modell wurde durch biochemische Untersuchungen impliziert (Raetz et al. 2013) und anhand unserer, durch Überexpression beider Rezeptoren in HEK293 Zellen erhobenen Daten bestätigt (Abbildung 8). Meine Daten weisen darauf hin, dass Gram-positive Bakterien den TLR11/12-Komplex nicht aktivieren. Zusätzlich implizierten auch meine Befunde Profilin als Liganden von TLR11/12.

4.1.2 Endosomaler TLR13 erkennt eine spezifische Sequenz der 23S rRNA

Als letzter Kandidat für die Erkennung bakterieller RNA qualifizierte sich wegen der Unc93B1-Abhängigkeit und damit einer endosomalen Lokalisation bei zusätzlichem Ausschluss der TLR8, -11 und -12, der TLR13. Für diesen Rezeptor war kein spezifischer Ligand beschrieben worden, er galt als *orphan*- (Waisen-) Rezeptor-

molekül. Seine Überexpression vermittelte Responsivität auf eine Konfrontation mit hitzeinaktivierten Gram-positiven Bakterien (Abbildung 9) und deren Total-RNA (Abbildung 10). Die stimulierende Aktivität galt es anschließend einzuengen. Aus der Total-RNA von *S. aureus* wurde per HPLC von Stefan Bauer und Kollegen die hochmolekulare (hmw) und die niedermolekulare (lmw) Fraktion isoliert. Die hmw Fraktion, die 23S und 16S ribosomale (r) RNA sowie hmw mRNA enthaltend, aktivierte *Tlr23479*^{-/-} Makrophagen, während die lmw RNAs (5S rRNA, tRNA und kleine mRNA) keine Produktion von proinflammatorischen Zytokinen induzierte (Abbildung 12). Dieser Befund implizierte eine hmw RNA als Ligand von TLR13. Die 23S und die 16S rRNA wurden daraufhin nach elektrophoretischer Auftrennung von Anne Krüger ausgeschnitten, aufgereinigt und in *Tlr23479*^{-/-} Makrophagen transfiziert. Die 23S rRNA repräsentierte die stimulierende Aktivität. Die 23S rRNA hat eine Größe von ca. 2,9 kb und enthält 6 Domänen (Petrov et al. 2013). Die ribosomalen RNAs dienen wegen ihrer hohen Konservierung innerhalb der Bakterien als phylogenetisches Markermaterial. Während der Evolution konservierte Gen-Sequenz-Bereiche, die nach dem Prinzip „*survival of the fittest*“ (der Stärkste überlebt) „weitervererbt“ wurden, erlaubten eine Etablierung von Bakterien in fast allen Lebensräumen (Pei et al. 2009). Genprodukte zur Modifikation von rRNAs, um z. B. Resistenzen gegenüber MLS-Antibiotika zu vermitteln, reichen phylogenetisch über vier Millionen Jahre zurück (Bhullar et al. 2012). Von den 24 bekannten Modifikationsmotiven innerhalb eines konservierten Bereiches der 23S rRNA wurden drei Segmente, die ein Adenin beinhalten, welches durch Methylierung die Fitness der Bakterien unter spezifischen Umständen fördert, ausgewählt (Abbildung 14). Sie wurden, nachdem sie in synthetischer Form vorlagen, als Kandidaten für das gesuchte immunstimulative PAMP untersucht (Branlant et al. 1981, Dunkle et al. 2010). Lediglich das ORN SaIII stimulierte intaktes Chaperon Unc93B1 exprimierende Makrophagen (Abbildung 15).

4.1.3 Methyltransferasen maskieren die 23S rRNA vor dem Immunsystem und vermitteln MLS-Resistenzen

SaIII ist im aktiven Zentrum des Ribosoms lokalisiert, aus dem neusynthetisierte Proteine das Ribosomen durch einen Tunnel verlassen, namentlich den PTL-Loop (Abbildung 63 A). Die Methylierung am A2058 in der 23S rRNA von *S. aureus* durch

die Erythromycin-Resistenz vermittelnden Methyltransferasen (Erm A, B und C) verändert die Konformation von der 23S rRNA, verhindert dadurch die Bindung von Makrolid, Lincosamid und Streptogramin B (MLS) Antibiotika und vermittelt somit eine spezifische Resistenz (Abbildung 63) (Lai und Weisblum 1971, Small et al. 2013).

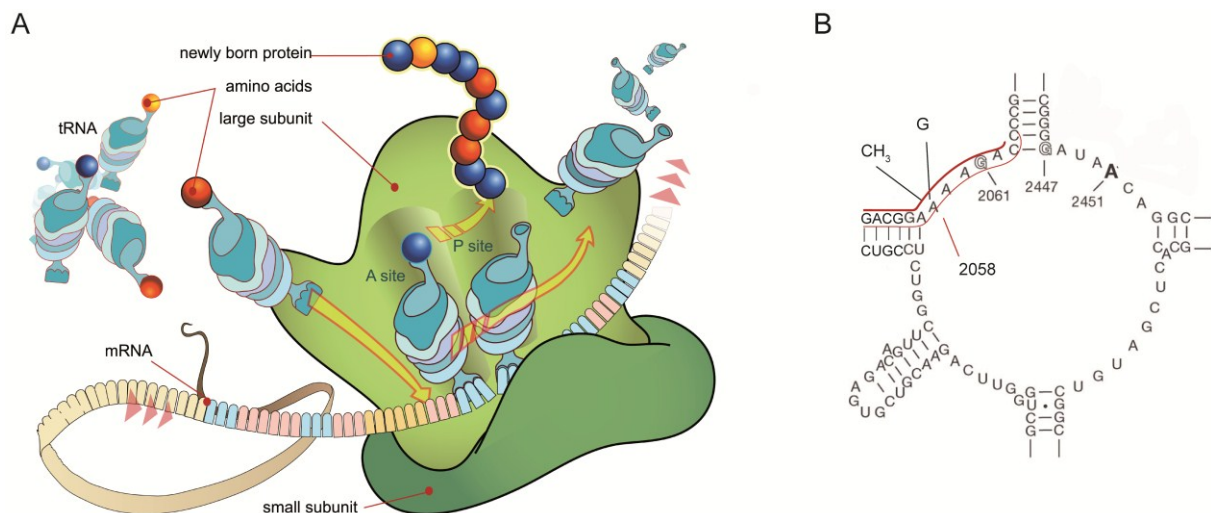


Abbildung 63: Methylierung oder Mutation des A2058 der 23S rRNA vermittelt Resistenz gegenüber MLS Antibiotika. (A) Schematische Abbildung der großen (*large*) und kleinen (*small*) Untereinheit des Ribosoms während der Proteinbiosynthese. Die mRNA bindet an die 16S rRNA und transloziert zum Startcodon, an dem sich die tRNA und die ribozymatisch Aminosäuren-polimerisierende 23S rRNA anlagern. Die neusynthetisierten Proteine verlassen das Ribosom durch den Tunnel oberhalb des PTL-Loop der 23S rRNA (<http://de.wikipedia.org/wiki/Ribosom>). (B) 23S rRNA Sequenz (rot) des A2058 lokalisiert am aktiven Zentrum (Polacek et al. 2001) Methylierung (CH₃) oder Mutation (G) des Adenosins A2058 vermitteln Antibiotikaresistenz.

Makrolid Antibiotika wie z. B. Erythromycin behindern durch ihre Bindung an den PTL-Loop der 23S rRNA die Proteinsynthese. Durch A2058 Methylierung wird der Tunnel zum Ausschleusen der neusynthetisierten Proteine blockiert, die Elongation der Proteinbiosynthese pausiert, woraufhin das Ribosom zerfällt (Tenson und Ehrenberg 2002). Methicilin-resistenter pathogener *S. aureus* (MRSA) exprimiert oft auch MLS (Makrolid, Lincosamid und Streptogramin) Resistenz vermittelnde Proteine. Seit der Entdeckung von MRSA steigt die Anzahl der resistenten Bakterienstämme stetig an. Zwischen 2003 und 2008 hat sich die MRSA

Infektionsrate verdoppelt (David et al. 2012) und Untersuchungen zufolge sterben in den USA mehr Menschen an MRSA-Infektionen als an Infektionen mit HIV (Klevens et al. 2007). Klinische Isolate von multiresistenten *S. aureus* aktivierten, Knochenmarksmakrophagen und entgingen der Immunerkennung erst nach Kultivierung in Erythromycin-haltigem Medium, wodurch die Expression der Erythromycin-Resistenz vermittelnden Methyltransferase induziert wurde (Abbildung 17). Zum Beispiel wird die Methyltransferase ermC nicht konstitutiv exprimiert, doch ist ihre Expression mit Erythromycin induzierbar (Bechhofer und Zen 1989). Die Resistenz vermittelnde Methylierung des A2058 durch ErmC maskiert die 23S rRNA vor der Wirtserkennung durch TLR13 (Abbildung 17 B).

Da SalII, hoch konserviert in 99,4% aller sequenzierter Bakterien (Pfister et al. 2005), auch in klinisch relevanten Gram-negativ bakterieller RNA vorliegt, wurde *E. coli* RNA untersucht. Auch in ihr lag eine TLR2, -3, -4, -7 und -9 unabhängige Aktivität vor (Oldenburg et al. 2012). *E. coli* exprimiert zwar ermC, doch in mutierter Form, weshalb diese Methyltransferase keine Erythromycinresistenz vermittelt (Thakker-Varia et al. 1985). Das Einbringen einer Erythromycinresistenz durch Transformation eines die Methyltransferase ermB tragenden Expressionsplasmides sowie die Transformation eines die von mir aus einem klinischen MRSA Stamm klonierten ermC vermittelnden Expressionsplasmids in *E. coli* zeigte, dass die TLR13-stimulative Aktivität durch die Methylierung aufgehoben wird. Während nämlich die 23S rRNA der so genetisch veränderten *E. coli* proinflammatorische Zytokine in *Tlr23479*^{-/-} Makrophagen induzierte, ging durch Kultivierung von erm-tragenden *E. coli* in Erythromycin-haltigem Medium die stimulative Aktivität verloren (Abbildung 19).

4.1.4 TLR13 erkennt eine 12 Nukleotide beinhaltende Sequenz der 23S rRNA

Nach Identifizierung eines stimulativen Segments der 23S rRNA von Bakterien wurde das aktivierende Motiv eingeeengt. Die TLR13 Abhängigkeit der Responsivität für SalII wurde per Überexpression einer Punktmutation (A2054G) tragenden TLR13 Mutante und einen *knock-down* der TLR13 mRNA per Transfektion von siRNA bestätigt. Die Unresponsivität von mit MapK1 mRNA-spezifischer siRNA transfizierten Zellen zeigte, dass TLR13 TLR-typisch Gene proinflammatorischer Zytokine über den MapK1 (ERK2) Signalweg aktiviert (Abbildung 64). Die Analyse plasmazytoider

dendritischer Zellen (pDCs) in Kooperation mit Hubertus Hochrein identifizierte ebenfalls TLR13 als SaIII Sensor (Oldenburg et al. 2012). Unabhängige Analysen bestätigten durch Untersuchung myeloider DCs und siRNA vermittelten *knock-down* von TLR13 sowie Verwendung von *Tlr13*^{-/-} Makrophagen die 23S rRNA als TLR13 Ligand (Hidmark et al. 2012; Li and Chen 2012).

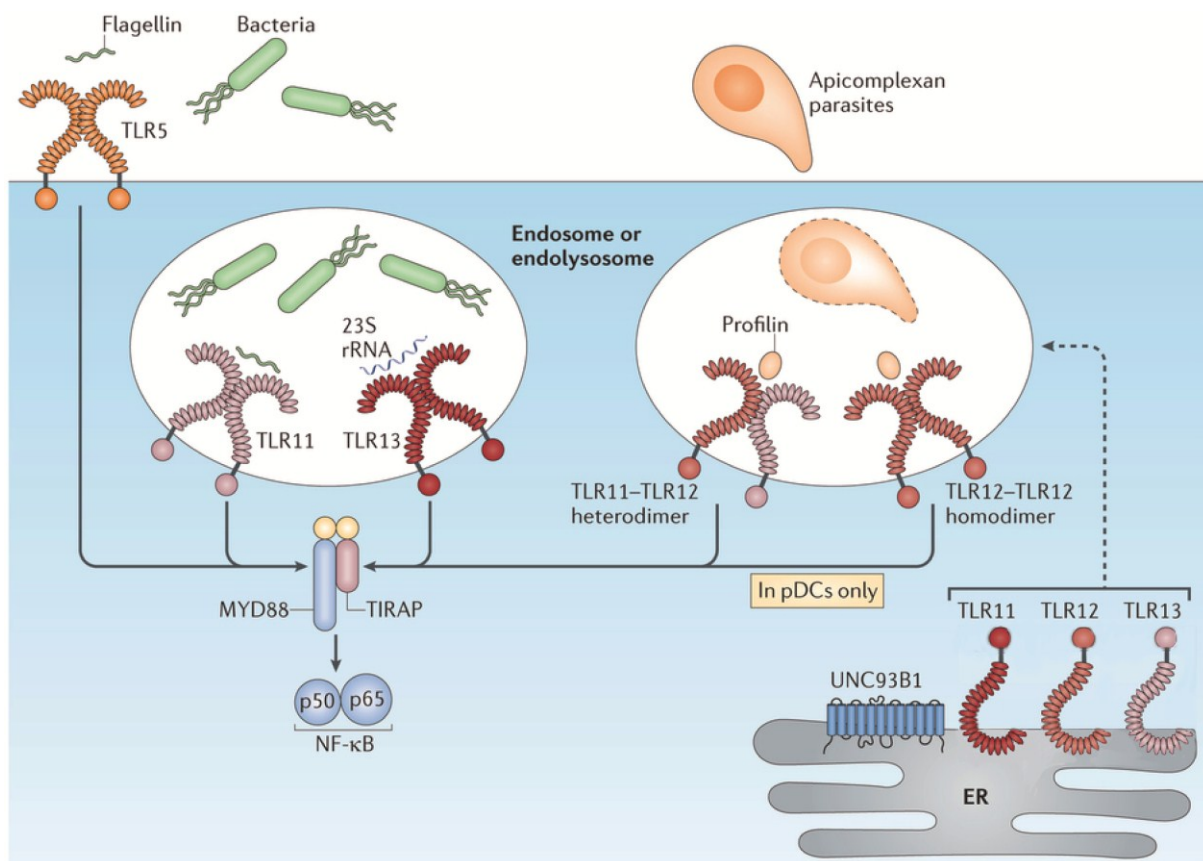


Abbildung 64: Signaltransduktion der endosomalen Rezeptoren TLR11, -12 und -13.

Das Chaperon Unc93B1 unterstützt die Translokation von TLR3, -7, -8, -9, -11, -12 und -13 vom endoplasmatischen Retikulum ins Endosom. Während TLR11 und -12 durch Profilin der Apicomplexa wie z. B. *Toxoplasma gondii* aktiviert werden, erkennt TLR13 eine spezifische Sequenz der bakteriellen 23S rRNA. TLR13 induziert über MyD88 neben NFκB den Mapk1 Signalweg, was zur Expression von proinflammatorischen Zytokinen führt. Abbildung verändert nach (Broz und Monack 2013).

Während eine Verkürzung von SaIII auf Sa19 oder gar Sa12 die stimulative Aktivität nicht umfänglich einschränkte, war Sa9 inaktiv (Abbildung 28), was darauf hindeutet, dass RNA 10-mer CGGA~~A~~AGACC die Kernsequenz des TLR13 Liganden

repräsentiert. Dessen Integrität war eine unbedingte Voraussetzung der Stimulation von TLR13, denn jegliche untersuchte Punktmutation ging mit Inaktivität einher. Aktuelle Studien bestätigen, dass die Immunantwort von Mäusen auf Infektion mit viablem *Streptococcus pyogenes*, einem Gram-positiven Bakterium, von TLR2 und TLR13 abhängig ist (Fieber et al. 2015). Also müsste die Blockierung von TLR2 und TLR13 Mäuse vor einer durch Gram-positiv bakterielle Sepsis ausgelöste Pathologie bei gleichzeitiger Behandlung der Infektion mit Antibiotika schützen. Die Anpassung der Bakterien an die Wirtserkennung durch Modifikationen wie in diesem Fall der Methylierung des A2058 impliziert, dass der auf die spezifische Sequenz der 23S rRNA beschränkte Sensor TLR13 Wirte nicht umfassend vor bakteriellen Infektionen schützen kann. Unsere phylogenetischen Analysen (S. Rahman, und D. Beisser, Essen) implizieren, dass TLR13 laut der Evolution von Tieren zunächst ausschließlich exprimiert wurde und sich später ein weiterer PRR „dazugesellt“ haben könnte (Oldenburg et al. 2012, Fieber et al. 2015). Womöglich würde dies die Abwesenheit der Expression von TLR13 in Primaten und anderen Tetrapoden erklären.

4.2 TLR8 als TLR13 Äquivalent im Menschen

Zunächst wurden humane primäre mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMC, *peripheral blood mononuclear cells*) frisch isoliert und auf ihre Responsivität auf Sa19 und dessen am A6 methylierten Variante Sa19m untersucht (Tabelle 15). Diese Zellpopulation enthielt alle Immunzellen bis auf die Erythrozyten und polymorphnukleären Zellen (PMN), namentlich Neutrophile wie auch Eosinophile, die wegen ihrer Dichte (mehr als 1.077 g/ml) während der standardisierten Aufreinigung verloren gehen. PBMCs reagierten nicht lediglich auf das bakterielle 23S rRNA repräsentierende ORN Sa19, sondern auch auf die vom Maus-Immunsystem nicht erkannte methylierte Variante Sa19m (Abbildung 29). Dieser Befund zeigte, dass im Menschen TLR13 durch einen anderen Sensor ersetzt worden war und dass dieser Sensor oder diese Sensoren Sequenz-unspezifischer sind. Mit dem Ziel eine genomweite Suche nach dem Sensor per siRNA *screen* (oder Expressionsklonierung) durchzuführen, suchten wir nach einer Sa19-responsiven Zelllinie. Zunächst prüften wir immortalisierte B-Zellen und Fibroblasten von IRAK4- und TIRAP-defizienten Menschen (Picard et al. 2003). Von den uns vorliegenden B- und

T-Zell-, Erythrozyten- und Fibroblasten Zelllinien wie auch monozytoiden Zelllinien reagierte jedoch keine auf das ORN Sa19 (Tabelle 16).

Da Mitochondrien laut Endosymbiontentheorie ursprünglich prokaryotische Zellen waren, untersuchte unser Gruppenmitglied Chiranjeevi Chebrolu deren große ribosomale RNA auf Sa19 ähnliche Sequenzmuster. Während der Evolution ging unnötige genetische Information verloren und so stellt die mitochondrielle 16S rRNA das Äquivalent zur großen bakteriellen 23S rRNA dar. Chiranjeevi Chebrolu identifizierte im Genom von *Bos Taurus* (Bt) und später auch im Menschen eine Sequenz in der mitochondriellen 16S rRNA mit identischem Kernmotiv „GGAAAGA“ zu Sa19, namentlich BtmtD3_4. Dieses synthetisch vorliegende ORN stimulierte murine Knochenmarksmakrophagen nicht, aber aktivierte hPBMCs hingegen besser als Sa19 (Abbildung 31).

4.2.1 Rolle der humanen endosomalen TLR in der Erkennung von bakterieller und mitochondrieller RNA

Zuletzt wurden von uns die monozytoiden Zelllinien THP-1 und U937 zu Makrophagen differenziert und mit den ORN konfrontiert. Während undifferenzierte und 8 Tage differenzierte (8ddi) THP-1 Zellen nicht auf die ORN reagierten, induzierten 3 Tage differenzierte (3ddi) THP-1 Zellen eine signifikante Menge an pro-inflammatorischem IL-8 (Abbildung 32). Die U937 Zellen wiesen hingegen auch nach Differenzierung mit PMA keine Responsivität auf (Daten nicht gezeigt). Wir führten deshalb eine die undifferenzierten, 3ddi und 8ddi THP-1 Zellen miteinander vergleichende Transkriptomanalyse durch. Neben sechs anderen Nicht-Zytokinrezeptoren implizierte dies TLR8 als mögliches Molekül (Abbildung 33). Durch eine Inhibition der endosomalen Funktionalität mit Chloroquin und Cytochalasin D wurde die Responsivität von 3ddi THP-1 Zellen sowie PBMC auf Sa19 aufgehoben. Dies implizierte eine Involvierung eines endosomalen TLR, namentlich z. B. TLR8, in die Erkennung der bakteriellen und mitochondriellen RNA. Unterstützt wird diese Annahme durch Expressionsanalysen anderer von B-, T- und NK-Zellen, in denen im Gegensatz zu einer leichten Expression in Monozyten keine TLR8 mRNA nachgewiesen wurde. Dies erklärt womöglich die Nicht-Responsivität der getesteten Zelllinien (Tabelle 16) nach Konfrontation mit den ORN (Hornung et al. 2002). Interessanterweise stellt auch die Wahl des Transfektionsreagens einen wichtigen

Faktor dar. Während Sa19 den stärksten Effekt auf 3ddi THP-1 Zellen hatte, wenn es mit Lipofectamin 2000 transfiziert wurde, erzielte die Transfektion von BtmtD3_4 eine stärkere Zytokin-Induktion bei Verwendung von pLA (Abbildung 34).

Transfektionsreagenzien komplexieren mit der RNA oder DNA, komprimieren sie und neutralisieren deren Ladung, um die Aufnahme in die Zelle durch Endozytose zu verbessern (Dean 2005). Die Varianz der chemischen Methoden ist groß. Die verschiedentliche Anwendung kationischer Liposomen (lipoplex), von Polymeren (polyplex), einer Kombination von beiden oder von Calciumphosphat zeigt die klinische Bedeutsamkeit dieses Faktors bei z. B. zielgerichteter Applikation von Pharmazeutika und der Einbringung von Nukleinsäuren und Proteinen in spezifische Zellen. Eine wichtige Rolle spielt dabei die enzymatische Degradation, die Aufnahme und die intrazelluläre Halbwertszeit, welche durch Anlagerung von Zuckerresten oder Phosphatgruppen (Phosphorothioat, PSO) an die zu transfizierenden ORN erhöht wird (Furdon et al. 1989, Deleavey und Damha 2012). Lipoplexe (Dotap) werden durch Clathrin internalisiert, während Polyplexe (Lipofectamin, LyoVec, pLA) zusätzlich z. B. Caveolin rekrutieren, also Proteine, die in der Zellmembran lokalisiert die RNA-Komplexe binden und Endozytose vermitteln (Shabani et al. 2010, Moghaddam et al. 2011). Die Transfektionseffizienz hängt dabei von der Degradation der RNA, Komplexbildung sowie von der Expression von Caveolin und Clathrin in der Zellmembran ab (Shabani et al. 2010).

Nach Ermittlung des jeweils effektivsten Transfektionsreagenz für jedes ORN oder sonstige RNA-Präparationen konnte die Involvierung endosomaler TLR in die Erkennung mitochondrieller und bakterieller RNA durch die Inhibition des stimulierenden Effekts in Unc93B1 defizienten 3ddi THP-1 Zellen bestätigt werden (Abbildung 35). Auch die Erkennung von sowohl Gram-positiv als auch Gram-negativ bakterieller RNA, namentlich Total-RNA, 23S- und 16S rRNA war von endosomalen TLR abhängig (Abbildung 39). Untersuchungen auf mögliche LPS Kontamination der Total-RNA von *E. coli* hin waren negativ (Abbildung 40).

Die intrazellulären Rezeptoren wie TLR3, -7, -8 und -9 sind bereits als Nukleinsäurerezeptoren beschrieben und spezifische Liganden sind bekannt. TLR3 wird durch dsRNA und TLR9 durch nicht methylierte DNA aktiviert. TLR7 und -8 gelten als Sensoren von ORN wie z. B. RNA40 und einem breiten Spektrum an synthetischen, chemischen Substanzen wie z. B. Imidazoquinolin (Gorden et al. 2005; Gantier et al. 2008). Diese TLR weisen eine phylogenetische Ähnlichkeit

sowohl im Menschen wie auch in der Maus auf und beide Gene sind auf dem X Chromosom lokalisiert (Gantier et al. 2008). Trotz dieser Ähnlichkeiten werden sie zellspezifisch exprimiert. Während TLR7 hauptsächlich in pDC und in geringerem Maße in B-Zellen und Monozyten exprimiert wird, ist es in Monozyten/Makrophagen und myeloiden DC TLR8 (Hornung et al. 2002, Gantier et al. 2008, Alexopoulou et al. 2012). Die Expression von TLR7 in Monozyten/Makrophagen ist aber im Gegensatz zu TLR8 signifikant geringer und wird neben den erhobenen Daten des Gene-Array durch weitere Analysen bestätigt (Su et al. 2004). Um die Erkennung der mitochondriellen und bakteriellen rRNA exklusiv durch TLR8 zu bestätigen, wurden *Tlr8*^{-/-} 3ddi THP-1 Zellen im Rahmen einer gegenseitigen Zusammenarbeit von V. Hornung aus Bonn hergestellt und von uns angewandt. Ferner untersuchte ich mit TLR8-siRNA transfizierte 3ddi THP-1 Zellen auf ihre Reaktivität hin. Sowohl der *knock-out* wie auch der *knock-down* von TLR8 konnte signifikant bzw. vollständig eine Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen auf Konfrontation mit den ORN BtmtD3_4, Sa19 sowie RNA40 oder R848 inhibieren (Abbildung 43, Abbildung 44). Nicht nur spezifische, synthetische ORN aktivierten TLR8, sondern auch die Transfektion von 23S, 16S und 5S rRNA sowohl von *S. aureus* als auch *E. coli* aktivierte wt Kontrollen, aber induzierte keine proinflammatorischen Zytokine in *Tlr8*^{-/-} 3ddi THP-1 Zellen (Abbildung 45). Die TLR8 abhängige Erkennung in PBMC konnte mittels eines TLR8 spezifischen, inhibitorischen ODN, namentlich dem T8i, nachgewiesen werden (Abbildung 46). TLR8 wurde als Sensor für Gram-negativ bakterielle RNA und einzelsträngige (ss) RNA mit AU Motiven beschrieben (Forsbach et al. 2008, Cervantes et al. 2013). Ich beobachtete die Erkennung der mitochondriellen 16S und der bakteriellen 23S rRNA sowie aller anderen rRNA von Gram-negativen und -positiven Bakterien. Die TLR8 abhängige AU Aktivierung konnte durch die Konfrontation mit Sa12 (GACGGAAAGACC) und der U (Uridin) tragenden Variante Sa12s6U (GACGGUAAAGACC) sowohl in der Überexpression von hTLR8 in HEK293 als auch in PBMC bestätigt werden (Tabelle 15, Abbildung 47). Die Stimulation von Sa12 war in beiden Fällen U-abhängig, was die aktuelle Implikation von zwei Bindungsstellen von UG bzw. UA reicher RNA und freiem Uridin in der Ektodomäne von TLR8 bestätigt (Abbildung 65) (Tanji et al. 2013). Analysen zur Bindungskapazität von hTLR8 erklären auch den inaktiven Status von mTLR8. Bereits 2010 wurde eine 5 AS (RQSYA) lange Sequenz veröffentlicht, die in mTLR8 fehlt (Liu et al. 2010). Aktuelle Studien beschreiben diese Sequenz als essentiell für

die Funktion von hTLR8. Ein Furin-ähnliche Proprotein Convertase und die Endoprotease Cathepsin binden im Z-Loop, der zwischen den LRR Domänen 14 und 15 lokalisiert ist, sowie an die oben genannte Sequenz. Durch proteolytische Spaltung wird TLR8 in die aktive Form transformiert (Abbildung 65) (Tanji et al. 2013, Ishii et al. 2014, Geyer et al. 2015). Biochemische und -physische Untersuchungen identifizierten zwei Bindungsstellen von TLR8 für ssRNA und Uridin (Abbildung 65) (Geyer et al. 2015, Tanji et al. 2015). Die Bindungsstellen für RNA40 sind in LRR11-14 und 16-18 lokalisiert, während Uridin mit Aminosäuren in den LRR9-13 und im Z-loop interagiert (Tanji et al. 2015).

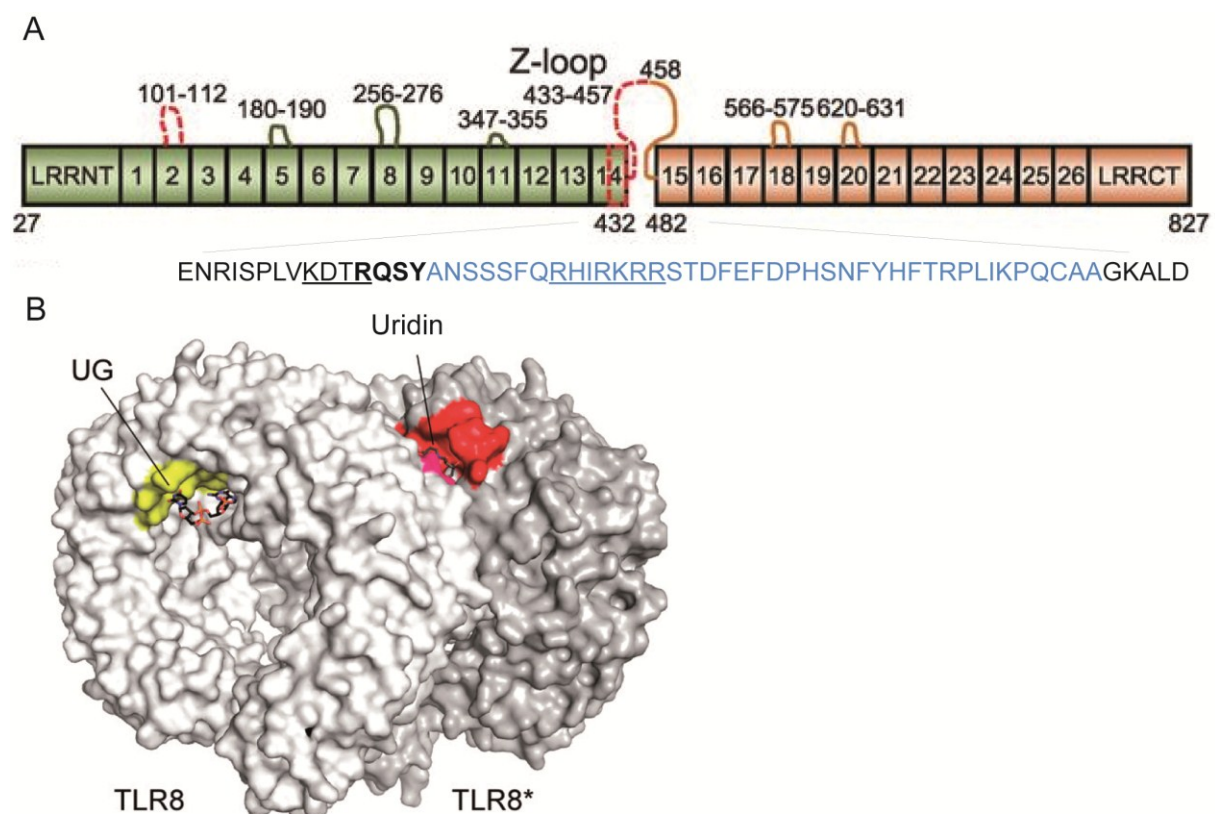


Abbildung 65: Strukturmodell der Ektodomäne von hTLR8. (A) Leucin-reiche Domäne von hTLR8 mit den Bindungsstellen der Convertase (unterstrichen) im Z-Loop (blau) zwischen Domäne 14 und 15 (Tanji et al. 2013, Ishii et al. 2014). (B) Kristallstruktur von dimerisierten TLR8 Domänen sowie den Bindungsstellen für Uridin und der bakteriellen und mitochondriellen rRNA (UG) (Geyer et al. 2015).

4.2.2 Relevanz von TLR8 in der durch Gram-positiv und Gram-negativ bakteriellen Infektion vermittelten Sepsis

Wir zeigten, dass humaner TLR8 nicht lediglich ein humanes Äquivalent von mTLR13 darstellt, sondern dessen Sequenz die unspezifische Bindung und die Erkennung sowohl von bakterieller als auch mitochondrieller rRNA vermittelt. Dementsprechend wurde die Rolle von TLR8 in der Erkennung von hitzeinaktivierten (hi) sowie auch viablen Gram-positiven und -negativen Bakterien untersucht. Während parentale 3ddi THP-1 Zellen dosisabhängig TNF nach Konfrontation mit hi *E. coli* produzierten, war bei Abwesenheit von TLR8 (in *Tlr8*^{-/-} und *Unc93b1*^{-/-} 3ddi THP-1 Zellen) die Responsivität signifikant reduziert (Abbildung 48). Wir implizierten TLR2 und TLR13 als Hauptinduktoren der Immunantwort auf Infektion mit Gram-positiven Bakterien (Oldenburg et al. 2012). Konsequenterweise kombinierte ich eine Blockade von TLR8 und TLR2 in der Zellkultur humaner PBMC. Die Responsivität der 3ddi *Tlr8*^{-/-} und *Unc93b1*^{-/-} THP-1 Zellen auf Konfrontation mit hiSa und hiEc wurde durch die Applikation von blockierendem monoklonalem TLR2 Antikörper (T2.5) signifikant oder vollständig blockiert (Abbildung 49). In PBMC konnte dieser Effekt ebenfalls beobachtet werden. Nach Applikation des endosomalen Inhibitors Chloroquin in Kombination mit T2.5 induzierten PBMCs keine proinflammatorischen Zytokine nach Infektion mit lebenden Bakterien mehr (Abbildung 51, Abbildung 66).

Polymorphismen im TLR8 Gen sind mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko an pulmonaler Tuberkulose, ausgelöst durch das Gram-positive Bakterium *Mycobacterium tuberculosis*, assoziiert (Davila et al. 2008). Studienergebnisse, zusammen mit den hier erhobenen Daten, deuten auf die substanzielle Rolle von TLR8 in der durch Bakterien induzierten Sepsis als auch möglicherweise in der durch Traumata verursachten sterilen Entzündungsreaktion hin. Weitere Untersuchungen mit Vollblut von an Sepsis erkrankten Patienten mit dem Ziel, die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine durch Blockade von TLR2 und TLR8 zu inhibieren, soll der nächste Schritt sein, um die hier erhobenen Befunde auf ihre klinische Relevanz hin zu prüfen. Dies könnte die Grundlage für eine Behandlung im frühen akuten Stadium der bakteriell induzierten Sepsis sein.

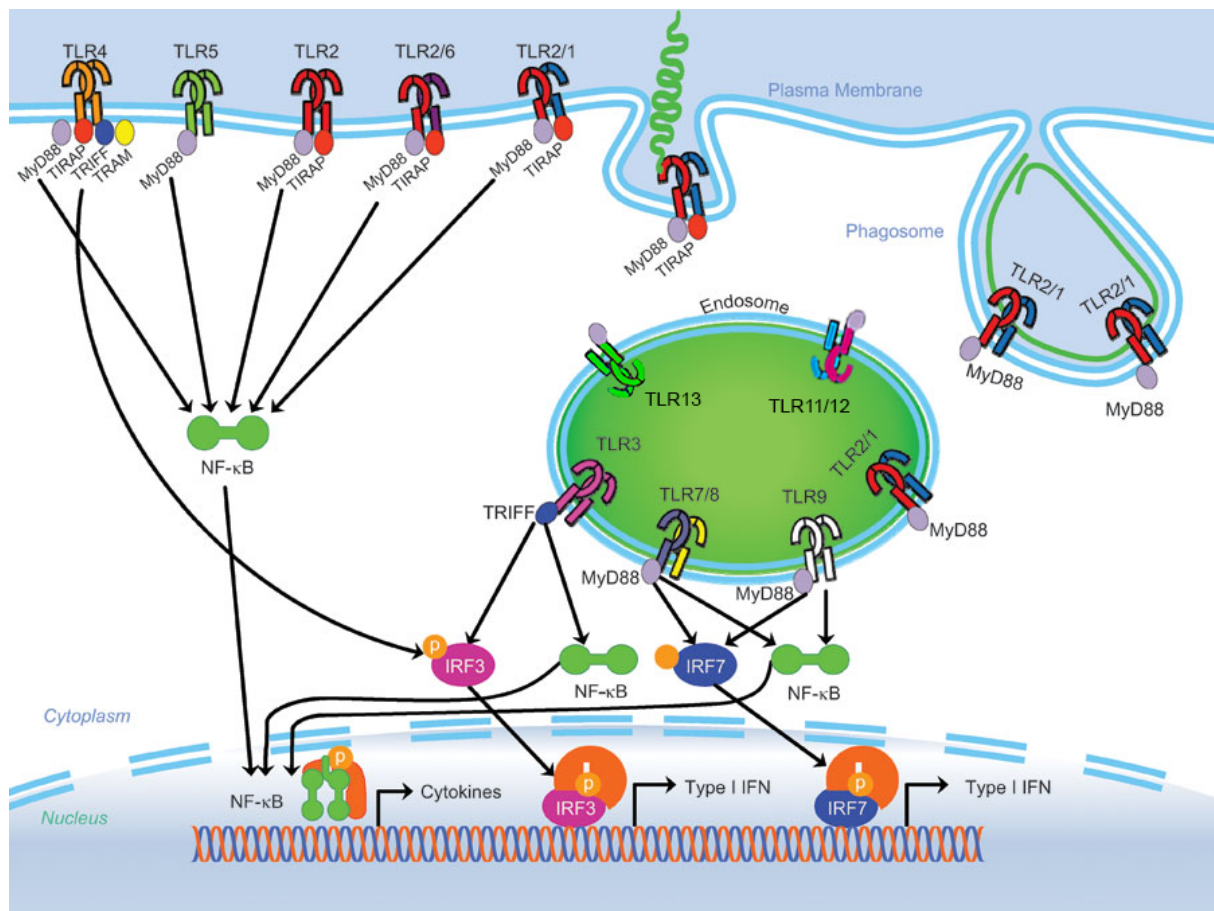


Abbildung 66: Schema der TLR vermittelten Zytokininduktion. TLR8 wird durch das Chaperon Unc93B1 vom ER zum Endosomomen transportiert. Bakterielle und mitochondrielle, ribosomale RNA induziert über MyD88 die Expression von proinflammatorischen Zytokinen. Verändert nach Cervantes et al. (2012).

4.3 RIG-I als Sensor für Gram-negativ bakterielle RNA

Auf der Suche nach RNA Rezeptor/en zogen wir in Erwägung MDA5 und RIG-I auf ihre Empfindlichkeit für Gram-positive und -negative Bakterien hin zu untersuchen. Ich bestätigte, dass die Applikation von Gram-negativen aber nicht von -positiven Bakterien RIG-I (*Retinoic-inducible gene 1*) aber nicht MDA5 (*melanoma differentiation-associated protein 5*) aktiviert (Abbildung 52) (Ferstl 2009, Dissertation). LGP2 (*laboratory of genetics and physiology 2*) wird aufgrund des Fehlens einer signalgebenden CARD Domäne eine regulierende Funktion zugeschrieben und wurde deshalb in dieser Arbeit nicht weiter untersucht. Ich konfrontierte HEK293 Zellen, die RIG-I überexprimierten, mit der Total-RNA von

verschiedenen Bakterien. RIG-I Responsivität beobachtete ich lediglich auf Konfrontation mit Gram-negativer, namentlich *E. coli* und *M. catarrhalis*, Total-RNA (Abbildung 53). Zur Einengung der stimulativen Aktivität wurden die großen ribosomalen (23S und 16S rRNA) und die Fraktion der kleinen RNAs (5S rRNA und tRNA) durch Gelelektrophorese separiert und anschließend aufgereinigt. Meine anhand von RIG-I überexprimierende Zellen erhobenen Befunde implizierten die kleinen RNAs als aktivierende Fraktion (Abbildung 54). Nach einer spezifischeren Auftrennung der niedermolekularen Fraktion identifizierten wir die RIG-I stimulative Aktivität in der tRNA (Abbildung 55). Die Transfektion von Gram-positiv bakterieller tRNA induzierte hingegen keine Luziferaseaktivität und bestätigte, dass exklusiv Gram-negativ bakterielle RNA ein RIG-I aktivierendes Potential hat (Abbildung 52). Durch die Analyse des Überstandes von Wildtyp sowie Unc93B1 defekten (3D) Knochenmarksmakrophagen konnte zum einen die Stimulation der Gram-negativ bakteriellen tRNA bestätigt und zum anderen durch die Responsivität der 3D-Zellen eine Involvierung der endosomalen Nukleinsäure-Rezeptoren ausgeschlossen werden (Abbildung 57).

Es ist bekannt, dass RIG-I am 5'-Terminus triphosphorylierte virale dsRNA erkennt (Hornung et al. 2006). Untersuchungen zur Identifikation des aktivierenden Strukturmotivs viraler RNA identifizierten eine *blunt end* 5'-trisphosphorylierte dsRNA (Schlee et al. 2009, Schmidt et al. 2009). Ein Überhang am 3'-Terminus der viralen RNA minderte zwar die stimulative Wirkung, konnte aber im Gegensatz zu einem Überhang am 5'-terminalen Ende RIG-I aktivieren (Schlee et al. 2009). Untersuchungen von Sendai und Grippe Viren (- Strang ssRNA Viren) zeigten eine RIG-I abhängige IFN β Induktion nach Virusinfektion (Rehwinkel et al. 2010). Es wird vermutet, dass die „Pfannenstiel“ Konformation, die während der viralen Replikation als RNA-RNA Intermediat auftritt, RIG-I stimuliert (Pichlmair et al. 2006, Schlee et al. 2009).

Ich ging von der Hypothese aus, dass die bakterielle tRNA RIG-I mit ihrem Pyro-, bzw. Triphosphat-Motiv aktiviert. Durch die Hydrolyse von Pyrophosphorylierungen am 5'-Terminus der bakteriellen RNA durch Ciap (*Calf intestinal alkaline phosphatase*) oder RppH (RNA *pyrophosphorydrolase*) hob ich die RIG-I abhängige Responsivität auf (Abbildung 60). Die Phosphatase RppH ist ein essentielles Enzym in *E. coli*, das den Abbau der mRNA einleitet, um überflüssige Genexpression zu vermeiden und abgelesene mRNA vor Modifikationen zu schützen (Vasilyev und

Serganov 2015). RppH gehört zur Familie der Nudix Proteine (Phosphohydrolasen) und entfernt Pyrophosphate vom 5'-Terminus der mRNA, um sie für den Abbau vorzubereiten (Deana et al. 2008). RNase E bindet anschließend an das 5'-Monophosphat der mRNA, um sie zu zerlegen. Das Triphosphat-Motiv am 5'-Terminus unterscheidet fremde (pathogene) von wirtseigener RNA. Die eukaryotische RNA im Zytoplasma enthält ausschließlich Monophosphate und kann somit RIG-I nicht stimulieren (Shatkin und Manley 2000, Xiao et al. 2002, Fromont-Racine et al. 2003).

Kristallstrukturanalysen identifizierten die C-Terminale Domäne (CTD) von RIG-I als Bindungsstelle der triphosphorylierten (ppp) viralen RNA (Wang et al. 2010). Die CTD bindet die pppRNA. Dies führt zu einer Konformationsänderung, die zur Annäherung der RNA an die Helikase und schließlich zu deren Bindung führt. Durch diese strukturelle Änderung werden die Card-Domänen frei und können mit ihrem Adaptermolekül interagieren (Kolakofsky et al. 2012). Fehlt dieses Adaptermolekül, namentlich IPS-1/MAVS, kommt es zu einer signifikanten Reduktion der RIG-I Aktivierung nach Konfrontation mit der Total- sowie der tRNA (Abbildung 61). Zusammen mit meinem Ergebnis eines Pilotexperiments zur Detektion der IRF3 Phosphorylierung deuten meine Daten auf den für RIG-I typischen Signalweg zur Expression von Typ-I Interferonen als ursächlich hin. Es gibt bisher wenige Studien zur tRNA Phosphorylierung in Bakterien, aber die vorliegenden Ergebnisse implizieren einen diesbezüglichen Unterschied zwischen Gram-positiver und -negativer tRNA. Die fehlende stimulative Wirkung der *S. aureus* tRNA auf RIG-I könnte durch Mangel oder den schnelleren Abbau eines Polyphosphats am 5'-Terminus der tRNA bedingt sein. Analysen des Phosphorylierungsstatus der Gram-positiven und -negativen bakteriellen Total- und tRNA stehen noch aus. Meine Daten implizieren RIG-I, als Rezeptor viraler RNA bereits bekannt, demnach auch als Sensor für eine am 5'-Terminus triphosphorylierte tRNA Gram-negativer Bakterien.

5 Zusammenfassung

Das Immunsystem der Vertebraten musste sich während der Evolution stetig verbessern, um sich ebenfalls stetig verändernde invasive Pathogene wie Bakterien, Viren und Parasiten als „Fremdkörper“ zu erkennen. Diese Aufgabe erfüllen Rezeptorgruppen, die sowohl membrangebunden in der Plasmamembran und im Endosom, als auch (frei) im Zytoplasma lokalisiert sind. Eine dieser Rezeptorgruppen sind die Toll-like Rezeptoren (TLR), die z. B. in der Erkennung von Gram-negativen Bakterien eine wichtige Rolle spielen. TLR2 und -4 gelten als Mediatoren der Gram-negativ induzierten Sepsispathologie. Sensoren Gram-positiver Bakterien neben TLR2 waren unbekannt. Untersuchungen von *Myd88*^{-/-} und *Unc93B1* defekten primären Mausmakrophagen implizierten neben fehlenden *knock-out*-Phänotypen für IL-1 Typ Zytokine die Involvierung eines endosomalen TLRs in die Erkennung des Gram-positiven Bakteriums *Staphylococcus aureus*.

Im ersten Teil meiner Arbeit wurde TLR13, für den kein Ligand beschrieben war, als Rezeptor für ein spezifisches Segment Gram-positiv bakterieller 23S rRNA identifiziert. Durch Überexpression in HEK293 Zellen, Inaktivierung per Punktmutation, *knock-down* per siRNA Transfektion und *knock-out*, wurde die TLR13 Abhängigkeit der Erkennung des 23S rRNA Segments von *S. aureus* bestätigt. Zur Einengung der Liganden untersuchten wir drei hochkonservierte Strukturen mit bekannten Methylierungsmotiven, namentlich Sal, Sall und SalII, auf ihr TLR13 Aktivierungspotential hin. Lediglich SalII, das von Bakterien am zum Adenosin 2058 homologen Adenosin methyliert werden kann, induzierte die Expression proinflammatorischer Zytokine. SalII wurde auf 19 Nukleotide und dann auf die Konsensussequenz GACGGAAAGACC eingengt. Lokalisiert nahe dem katalytischen Zentrum des Ribosomen wird es durch MLS-Antibiotika gebunden, was die Proteinbiosynthese blockiert. Durch Überexpressionen von Methyltransferasen (*ermC* und *ermB*) in *Escherichia coli* verlor die jeweilige 23S rRNA ihr TLR13-stimulatives Potential. Zusammengefasst implizierten meine Daten TLR13 als Rezeptor für eine spezifische Sequenz innerhalb der bakteriellen 23S rRNA, deren Methylierung oder Mutation die Bindung an MLS-Antibiotika und TLR13 verhindert.

Im zweiten Projekt befasste ich mich mit der Frage, welche/r Rezeptor/en im Menschen, der lediglich TLR1-10 exprimiert, die Rolle von TLR13 als Sensor der 23S

rRNA „übernommen“ hat/haben. Mononukleare Zellen (PBMC) induzierten nach Konfrontation mit Sa19 und mit der am A2058 Analogon (A7) methylierten Variante Sa19m proinflammatorische Zytokine. Auf der Suche nach einer responsiven Zelllinie identifizierte ich mit PMA 3 Tage differenzierte (3ddi) THP-1 Zellen als reaktiv im Gegensatz zu un- und 8 Tage differenzierten Zellen gegenüber Sa19. Parallel wurde ein Sa19-ähnliches Segment der mitochondrialen 16S rRNA identifiziert, namentlich BtmtD3_4, das ebenfalls stimulatorisch in Mensch-spezifischer Weise ist. Unsere Untersuchung der mRNA Expression von den dreierlei unterschiedlich differenzierten THP-1 Zellen implizierte TLR8 als möglichen Kandidaten, was durch siRNA vermittelten *knock-down* und die Überexpression in HEK293- und RAW246.7 Zellen erhärtet wurde. Weitere Untersuchungen von 3ddi *Unc93b1*^{-/-} sowie *Tlr8*^{-/-} THP-1 Zellen unterstützten diese Daten. In THP-1 Zellen und PBMC induzierten die Total-RNA und die bakteriell- und ribosomalen 23S, 16S und 5S rRNA Fraktionen ebenfalls TLR8 abhängig proinflammatorische Zytokine. Durch die Applikation von T2.5, eines TLR2 spezifischen monoklonalem Antikörper, wurde die Responsivität von 3ddi *Tlr8*^{-/-} THP-1- und *Unc93b1*^{-/-} Zellen auf hitzeinaktivierten *S. aureus* und *E. coli* signifikant oder gar vollständig inhibiert. In PBMC die mit lebenden Bakterien infiziert wurden führte die Koapplikation von T2.5 und dem endosomalen Inhibitor Chloroquin zu einer ebenfalls weitgehenden Blockade der Zytokininduktion. Die erhobenen Daten schlagen die Blockade von TLR8 und -2 neben Antibiotikatherapie als therapeutischen Eingriff in den Frühphasen bakterieller Infektionen vor.

Die RIG-I-like Helikasen (RLHs) sind neben TLR eine weitere Familie von Muster-erkennungsrezeptoren (PRR). Zu den im Zytoplasma lokalisierten Rezeptoren gehört RIG-I, der als viraler RNA Rezeptor fungiert. Untersuchungen von Mitgliedern unterschiedlicher Rezeptorfamilien auf ihre Responsivität nach Konfrontation mit Bakterien identifizierten RIG-I als Sensor für Gram-negative Bakterien. Die Konfrontation von RIG-I-überexprimierenden HEK293 Zellen identifizierte die tRNA als stimulative RNA Fraktion. Die Responsivität von *Unc93B1* defekten Maus-makrophagen implizierte eine TLR3, -7, -8, -9, -11, -12, und -13 unabhängige Aktivierung. Die punktuelle 5'-Hydrolyse der Total- und tRNA von Gram-negativen Bakterien inhibierte deren stimulatorisches Potential und implizierte eine am 5'-Terminus pyro- oder triphosphorylierte RNA als aktivierende Struktur. Diese Ergebnisse beschreiben RIG-I auch als Sensor für Gram-negativ triphosphorylierte tRNA und nicht lediglich von viraler RNA.

6 Summary

The immune system of vertebrates steadily improved during evolution to recognize constantly changing invasive pathogens such as bacteria, viruses and parasites. Pattern recognition receptors (PRR) localized in the plasma- or endosomal membrane and within the cytoplasm sense invading pathogens. Toll-like receptors (TLR) are one family of PRR that detect bacteria. TLR2 and 4 are major mediators of the sepsis pathology induced by Gram-negative bacterial infection. Specific sensors of Gram-positive bacteria besides TLR2 have been uncharacterized. MyD88- and Unc93B1 dependency combined with the lack of knock-out phenotypes for IL-1 type cytokines implied the involvement of an endosomal TLR in the recognition of the Gram-positive bacterium *Staphylococcus aureus*.

In the first part of my work a specific segment of Gram-positive bacterial 23S rRNA was identified as ligand for the orphan receptor TLR13. The TLR13 dependent detection of *S. aureus* RNA was confirmed by TLR13 overexpression in HEK293 cells, knock-out, point mutation, and knock-down via siRNA. To narrow down the stimulatory sequence within the 23S rRNA, we investigated three highly conserved 23S rRNA segments with known methylation motifs, namely Sal, Sall and SalII, and examined their potential to activate TLR13. Only SalII containing the adenosine 2058 equivalent which confers resistance to antibiotics upon its methylation induced pro-inflammatory cytokine production. After reducing the length of SalII to 19 nucleotides, we identified the consensus sequence GACGGAAAGACC. This sequence, located near the catalytic center of the ribosome, is bound by MLS antibiotics which blocks nascent protein growth. 23S rRNA lost its TLR13 stimulative potential by overexpression of methyltransferases (ermC and ermB) in *Escherichia coli*. In summary my data implied TLR13 as a receptor for a specific segment within the bacterial 23S rRNA. Methylation or mutation of A2058 prevents TLR13 recognition and binding of MLS antibiotics thereby causing escape from host surveillance and resistance, respectively.

The second project dealt with the identification of the receptor/s that substitute/s for TLR13 as a sensor of bacterial 23S rRNA, since humans express merely TLR1-10. Mononuclear cells (PBMC) transfected with SA19 and its variant Sa19m, methylated at A7 (A2058 equivalent) both induced pro-inflammatory cytokine

productions. Searching for an SA19 reactive cell line, I identified THP-1 cells differentiated with PMA for 3 days (3ddi) as responsive toward Sa19, while both undifferentiated and 8 ddi THP-1 cells are refractory. The Sa19-like mitochondrial 16S rRNA segment BtmtD3_4 also stimulated PBMC. However, its immune stimulatory potential was human specific. Our examination of the mRNA expression of 3ddi THP-1 cells implied TLR8 as possible candidate which was confirmed by siRNA mediated knock-down as well as over-expression in HEK293 and RAW246.7 cells. Further investigation of 3ddi *Unc93b1*^{-/-} and *TLR8*^{-/-} THP-1 cell supported these data. The bacterial total RNA and each 23S, 16S and 5S rRNA fractions induced TLR8 dependent pro-inflammatory cytokine production in THP-1 cells and PBMCs. This stimulatory effect was significantly or even completely abrogated in 3ddi *Tlr8*^{-/-} and *Unc93b1*^{-/-} THP-1 cells upon pretreatment with the TLR2 specific monoclonal antibody (T2.5). PBMC infection with living bacteria pretreated with T2.5 in combination with the endosomal inhibitor chloroquine also resulted in a substantial blockade of cytokine induction. Collectively, the data suggest TLR8/-2 blockade as possible therapeutic intervention in the early stage of bacterial infection induced sepsis.

Another family of PRRs besides TLRs is the RIG-I-like helicase (RLH) family. Members of which are localized within the cytoplasm. One of their members, namely RIG-I, is a viral RNA receptor. In search for receptors recognizing bacteria we identified RIG-I as a sensor for Gram-negative bacteria. RIG-I overexpressing HEK293 cells confronted with bacterial RNA preparations identified tRNA as stimulative motif. Also, responsiveness of *Unc93B1* defective murine macrophages implied a TLR3, -7, -8, -9, -11, -12, -13 independent activation. The selective 5'-phosphohydrolysis of total and tRNA of Gram-negative bacteria inhibited their stimulatory potential and implied a 5'-pyro- or -triphosphorylated RNA as activating structure. These results describe RIG-I as a sensor not only for viral RNA but also for Gram-negative triphosphorylated tRNA.

7 Literaturverzeichnis

- Adachi, O., T. Kawai, K. Takeda, M. Matsumoto, H. Tsutsui, M. Sakagami, K. Nakanishi and S. Akira (1998). "Targeted disruption of the MyD88 gene results in loss of IL-1- and IL-18-mediated function." *Immunity* 9(1): 143-150.
- Akira, S., S. Uematsu and O. Takeuchi (2006). "Pathogen recognition and innate immunity." *Cell* 124(4): 783-801.
- Alexopoulou, L., B. Desnues and O. Demaria (2012). "[Toll-like receptor 8: the awkward TLR]." *Med Sci (Paris)* 28(1): 96-102.
- Alexopoulou, L., A. C. Holt, R. Medzhitov and R. A. Flavell (2001). "Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3." *Nature* 413(6857): 732-738.
- Allen, I. C., M. A. Scull, C. B. Moore, E. K. Holl, E. McElvania-TeKippe, D. J. Taxman, E. H. Guthrie, R. J. Pickles and J. P. Ting (2009). "The NLRP3 inflammasome mediates in vivo innate immunity to influenza A virus through recognition of viral RNA." *Immunity* 30(4): 556-565.
- Andrade, W. A., C. Souza Mdo, E. Ramos-Martinez, K. Nagpal, M. S. Dutra, M. B. Melo, D. C. Bartholomeu, S. Ghosh, D. T. Golenbock and R. T. Gazzinelli (2013). "Combined Action of Nucleic Acid-Sensing Toll-like Receptors and TLR11/TLR12 Heterodimers Imparts Resistance to *Toxoplasma gondii* in Mice." *Cell Host Microbe* 13(1): 42-53.
- Bafica, A., H. C. Santiago, R. Goldszmid, C. Ropert, R. T. Gazzinelli and A. Sher (2006). "Cutting edge: TLR9 and TLR2 signaling together account for MyD88-dependent control of parasitemia in *Trypanosoma cruzi* infection." *J Immunol* 177(6): 3515-3519.
- Barral, P. M., D. Sarkar, Z. Z. Su, G. N. Barber, R. DeSalle, V. R. Racaniello and P. B. Fisher (2009). "Functions of the cytoplasmic RNA sensors RIG-I and MDA-5: key regulators of innate immunity." *Pharmacology & therapeutics* 124(2): 219-234.
- Bauer, S., B. Bathke, H. Lauterbach, J. Patzold, R. Kassub, C. A. Luber, B. Schlatter, S. Hamm, P. Chaplin, M. Suter and H. Hochrein (2010). "A major role for TLR8 in the recognition of vaccinia viral DNA by murine pDC?" *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(36): E139; author reply E140.
- Baum, A. and A. Garcia-Sastre (2010). "Induction of type I interferon by RNA viruses: cellular receptors and their substrates." *Amino Acids* 38(5): 1283-1299.
- Bechhofer, D. H. and K. H. Zen (1989). "Mechanism of erythromycin-induced ermC mRNA stability in *Bacillus subtilis*." *Journal of bacteriology* 171(11): 5803-5811.
- Bell, J. K., G. E. Mullen, C. A. Leifer, A. Mazzoni, D. R. Davies and D. M. Segal (2003). "Leucine-rich repeats and pathogen recognition in Toll-like receptors." *Trends Immunol* 24(10): 528-533.
- Berger M, Siggs O, Xia Y, Khovananth K and B. B (2010). Phenotypic Mutation 'Tlr13rev1', MUTAGENETIX (TM).
- Bezemer, G. F., S. Sagar, J. van Bergenhenegouwen, N. A. Georgiou, J. Garssen, A. D. Kraneveld and G. Folkerts (2012). "Dual role of Toll-like receptors in asthma and chronic obstructive pulmonary disease." *Pharmacol Rev* 64(2): 337-358.

- Bhullar, K., N. Waglechner, A. Pawlowski, K. Koteva, E. D. Banks, M. D. Johnston, H. A. Barton and G. D. Wright (2012). "Antibiotic resistance is prevalent in an isolated cave microbiome." *PLoS One* 7(4): e34953.
- Bone, R. C., R. A. Balk, F. B. Cerra, R. P. Dellinger, A. M. Fein, W. A. Knaus, R. M. Schein and W. J. Sibbald (1992). "Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine." *Chest* 101(6): 1644-1655.
- Branlant, C., A. Krol, M. A. Machatt, J. Pouyet, J. P. Ebel, K. Edwards and H. Kossel (1981). "Primary and secondary structures of Escherichia coli MRE 600 23S ribosomal RNA. Comparison with models of secondary structure for maize chloroplast 23S rRNA and for large portions of mouse and human 16S mitochondrial rRNAs." *Nucleic Acids Res* 9(17): 4303-4324.
- Brikos, C. and L. A. O'Neill (2008). "Signalling of toll-like receptors." *Handb Exp Pharmacol*(183): 21-50.
- Brinkmann, M. M., E. Spooner, K. Hoebe, B. Beutler, H. L. Ploegh and Y. M. Kim (2007). "The interaction between the ER membrane protein UNC93B and TLR3, 7, and 9 is crucial for TLR signaling." *J Cell Biol* 177(2): 265-275.
- Broz, P. and D. M. Monack (2013). "Newly described pattern recognition receptors team up against intracellular pathogens." *Nature reviews. Immunology* 13(8): 551-565.
- Burch-Smith, T. M. and S. P. Dinesh-Kumar (2007). "The functions of plant TIR domains." *Sci STKE* 2007(401): pe46.
- Campos, M. A., I. C. Almeida, O. Takeuchi, S. Akira, E. P. Valente, D. O. Procopio, L. R. Travassos, J. A. Smith, D. T. Golenbock and R. T. Gazzinelli (2001). "Activation of Toll-like receptor-2 by glycosylphosphatidylinositol anchors from a protozoan parasite." *J Immunol* 167(1): 416-423.
- Canton, J., D. Neculai and S. Grinstein (2013). "Scavenger receptors in homeostasis and immunity." *Nature reviews. Immunology* 13(9): 621-634.
- Cardoso, L. S., M. I. Araujo, A. M. Goes, L. G. Pacifico, R. R. Oliveira and S. C. Oliveira (2007). "Polymyxin B as inhibitor of LPS contamination of Schistosoma mansoni recombinant proteins in human cytokine analysis." *Microb Cell Fact* 6: 1.
- Cervantes, J. L., C. J. La Vake, B. Weinerman, S. Luu, C. O'Connell, P. H. Verardi and J. C. Salazar (2013). "Human TLR8 is activated upon recognition of Borrelia burgdorferi RNA in the phagosome of human monocytes." *Journal of leukocyte biology* 94(6): 1231-1241.
- Cervantes, J. L., B. Weinerman, C. Basole and J. C. Salazar (2012). "TLR8: the forgotten relative revindicated." *Cell Mol Immunol* 9(6): 434-438.
- Chan, S. L., T. Mukasa, E. Santelli, L. Y. Low and J. Pascual (2010). "The crystal structure of a TIR domain from Arabidopsis thaliana reveals a conserved helical region unique to plants." *Protein science : a publication of the Protein Society* 19(1): 155-161.
- Chi, H. and R. A. Flavell (2008). "Innate recognition of non-self nucleic acids." *Genome Biol* 9(3): 211.
- Childs, K., R. Randall and S. Goodbourn (2012). "Paramyxovirus V proteins interact with the RNA Helicase LGP2 to inhibit RIG-I-dependent interferon induction." *J Virol* 86(7): 3411-3421.

- Chuang, T. and R. J. Ulevitch (2001). "Identification of hTLR10: a novel human Toll-like receptor preferentially expressed in immune cells." *Biochimica et biophysica acta* 1518(1-2): 157-161.
- Coban, C., Y. Igari, M. Yagi, T. Reimer, S. Koyama, T. Aoshi, K. Ohata, T. Tsukui, F. Takeshita, K. Sakurai, T. Ikegami, A. Nakagawa, T. Horii, G. Nunez, K. J. Ishii and S. Akira (2010). "Immunogenicity of whole-parasite vaccines against *Plasmodium falciparum* involves malarial hemozoin and host TLR9." *Cell Host Microbe* 7(1): 50-61.
- Colonna, M. (2007). "TLR pathways and IFN-regulatory factors: to each its own." *European journal of immunology* 37(2): 306-309.
- Cui, S., K. Eisenacher, A. Kirchhofer, K. Brzozka, A. Lammens, K. Lammens, T. Fujita, K. K. Conzelmann, A. Krug and K. P. Hopfner (2008). "The C-terminal regulatory domain is the RNA 5'-triphosphate sensor of RIG-I." *Molecular cell* 29(2): 169-179.
- Dalpke, A. H., S. Zimmermann, I. Albrecht and K. Heeg (2002). "Phosphodiester CpG oligonucleotides as adjuvants: polyguanosine runs enhance cellular uptake and improve immunostimulative activity of phosphodiester CpG oligonucleotides in vitro and in vivo." *Immunology* 106(1): 102-112.
- David, M. Z., S. Medvedev, S. F. Hohmann, B. Ewigman and R. S. Daum (2012). "Increasing burden of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* hospitalizations at US academic medical centers, 2003-2008." *Infection control and hospital epidemiology : the official journal of the Society of Hospital Epidemiologists of America* 33(8): 782-789.
- Davila, S., M. L. Hibberd, R. Hari Dass, H. E. Wong, E. Sahiratmadja, C. Bonnard, B. Alisjahbana, J. S. Szeszko, Y. Balabanova, F. Drobniewski, R. van Crevel, E. van de Vosse, S. Nejentsev, T. H. Ottenhoff and M. Seielstad (2008). "Genetic association and expression studies indicate a role of toll-like receptor 8 in pulmonary tuberculosis." *PLoS Genet* 4(10): e1000218.
- Dean, D. A. (2005). "Nonviral gene transfer to skeletal, smooth, and cardiac muscle in living animals." *Am J Physiol Cell Physiol* 289(2): C233-245.
- Deana, A., H. Cellesnik and J. G. Belasco (2008). "The bacterial enzyme RppH triggers messenger RNA degradation by 5' pyrophosphate removal." *Nature* 451(7176): 355-358.
- Deleavey, G. F. and M. J. Damha (2012). "Designing chemically modified oligonucleotides for targeted gene silencing." *Chem Biol* 19(8): 937-954.
- Deshmukh, S. D., B. Kremer, M. Freudenberg, S. Bauer, D. T. Golenbock and P. Henneke (2011). "Macrophages recognize streptococci through bacterial single-stranded RNA." *EMBO Rep* 12(1): 71-76.
- Drage, M. G., H. C. Tsai, N. D. Pecora, T. Y. Cheng, A. R. Arida, S. Shukla, R. E. Rojas, C. Seshadri, D. B. Moody, W. H. Boom, J. C. Sacchettini and C. V. Harding (2010). "Mycobacterium tuberculosis lipoprotein LprG (Rv1411c) binds triacylated glycolipid agonists of Toll-like receptor 2." *Nat Struct Mol Biol* 17(9): 1088-1095.
- Dunkle, J. A., L. Xiong, A. S. Mankin and J. H. Cate (2010). "Structures of the *Escherichia coli* ribosome with antibiotics bound near the peptidyl transferase center explain spectra of drug action." *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(40): 17152-17157.
- Eady, E. A., J. I. Ross, J. L. Tipper, C. E. Walters, J. H. Cove and W. C. Noble (1993). "Distribution of genes encoding erythromycin ribosomal methylases

- and an erythromycin efflux pump in epidemiologically distinct groups of staphylococci." *J Antimicrob Chemother* 31(2): 211-217.
- Ewald, S. E., B. L. Lee, L. Lau, K. E. Wickliffe, G. P. Shi, H. A. Chapman and G. M. Barton (2008). "The ectodomain of Toll-like receptor 9 is cleaved to generate a functional receptor." *Nature* 456(7222): 658-662.
- Feng, Q., S. V. Hato, M. A. Langereis, J. Zoll, R. Virgen-Slane, A. Peisley, S. Hur, B. L. Semler, R. P. van Rij and F. J. van Kuppeveld (2012). "MDA5 detects the double-stranded RNA replicative form in picornavirus-infected cells." *Cell reports* 2(5): 1187-1196.
- Fernandes-Alnemri, T., J. W. Yu, P. Datta, J. Wu and E. S. Alnemri (2009). "AIM2 activates the inflammasome and cell death in response to cytoplasmic DNA." *Nature* 458(7237): 509-513.
- Fernandes-Alnemri, T., J. W. Yu, C. Juliana, L. Solorzano, S. Kang, J. Wu, P. Datta, M. McCormick, L. Huang, E. McDermott, L. Eisenlohr, C. P. Landel and E. S. Alnemri (2010). "The AIM2 inflammasome is critical for innate immunity to *Francisella tularensis*." *Nat Immunol* 11(5): 385-393.
- Ferstl, R. (2009). Die Rolle spezifischer Toll-like Rezeptoren in der Wirtserkennung von *Staphylococcus aureus* und bei der Stallstaub-vermittelten Protektion vor allergischem Asthma, Dissertation an der Technische Universität München.
- Fieber, C., M. Janos, T. Koestler, N. Gratz, X. D. Li, V. Castiglia, M. Aberle, M. Sauert, M. Wegner, L. Alexopoulou, C. J. Kirschning, Z. J. Chen, A. von Haeseler and P. Kovarik (2015). "Innate immune response to *Streptococcus pyogenes* depends on the combined activation of TLR13 and TLR2." *PLoS One* 10(3): e0119727.
- Forsbach, A., J. G. Nemorin, C. Montino, C. Muller, U. Samulowitz, A. P. Vicari, M. Jurk, G. K. Mutwiri, A. M. Krieg, G. B. Lipford and J. Vollmer (2008). "Identification of RNA sequence motifs stimulating sequence-specific TLR8-dependent immune responses." *J Immunol* 180(6): 3729-3738.
- Freaney, J. E., R. Kim, R. Mandhana and C. M. Horvath (2013). "Extensive cooperation of immune master regulators IRF3 and NFkappaB in RNA Pol II recruitment and pause release in human innate antiviral transcription." *Cell reports* 4(5): 959-973.
- Fromont-Racine, M., B. Senger, C. Saveanu and F. Fasiolo (2003). "Ribosome assembly in eukaryotes." *Gene* 313: 17-42.
- Furdon, P. J., Z. Dominski and R. Kole (1989). "RNase H cleavage of RNA hybridized to oligonucleotides containing methylphosphonate, phosphorothioate and phosphodiester bonds." *Nucleic Acids Res* 17(22): 9193-9204.
- Gadjeva, M., K. Takahashi and S. Thiel (2004). "Mannan-binding lectin--a soluble pattern recognition molecule." *Molecular immunology* 41(2-3): 113-121.
- Gal, P. and G. Ambrus (2001). "Structure and function of complement activating enzyme complexes: C1 and MBL-MASPs." *Curr Protein Pept Sci* 2(1): 43-59.
- Gantier, M. P., A. T. Irving, M. Kaparakis-Liaskos, D. Xu, V. A. Evans, P. U. Cameron, J. A. Bourne, R. L. Ferrero, M. John, M. A. Behlke and B. R. Williams (2010). "Genetic modulation of TLR8 response following bacterial phagocytosis." *Hum Mutat* 31(9): 1069-1079.
- Gantier, M. P., S. Tong, M. A. Behlke, D. Xu, S. Phipps, P. S. Foster and B. R. Williams (2008). "TLR7 is involved in sequence-specific sensing of single-stranded RNAs in human macrophages." *J Immunol* 180(4): 2117-2124.

- Geyer, M., K. Pelka and E. Latz (2015). "Synergistic activation of Toll-like receptor 8 by two RNA degradation products." *Nat Struct Mol Biol* 22(2): 99-101.
- Giedraitiene, A., A. Vitkauskienė, R. Naginiene and A. Pavilonis (2011). "Antibiotic resistance mechanisms of clinically important bacteria." *Medicina (Kaunas)* 47(3): 137-146.
- Girard, R., T. Pedron, S. Uematsu, V. Balloy, M. Chignard, S. Akira and R. Chaby (2003). "Lipopolysaccharides from *Legionella* and *Rhizobium* stimulate mouse bone marrow granulocytes via Toll-like receptor 2." *J Cell Sci* 116(Pt 2): 293-302.
- Gitlin, L., W. Barchet, S. Gilfillan, M. Cella, B. Beutler, R. A. Flavell, M. S. Diamond and M. Colonna (2006). "Essential role of mda-5 in type I IFN responses to polyriboinosinic:polyribocytidylic acid and encephalomyocarditis picornavirus." *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(22): 8459-8464.
- Gorden, K. B., K. S. Gorski, S. J. Gibson, R. M. Kedl, W. C. Kieper, X. Qiu, M. A. Tomai, S. S. Alkan and J. P. Vasilakos (2005). "Synthetic TLR agonists reveal functional differences between human TLR7 and TLR8." *J Immunol* 174(3): 1259-1268.
- Gorden, K. K., X. X. Qiu, C. C. Binsfeld, J. P. Vasilakos and S. S. Alkan (2006). "Cutting edge: activation of murine TLR8 by a combination of imidazoquinoline immune response modifiers and polyT oligodeoxynucleotides." *J Immunol* 177(10): 6584-6587.
- Gray, M. W., G. Burger and B. F. Lang (2001). "The origin and early evolution of mitochondria." *Genome Biol* 2(6): REVIEWS1018.
- Greaves, D. R. and S. Gordon (2009). "The macrophage scavenger receptor at 30 years of age: current knowledge and future challenges." *J Lipid Res* 50 Suppl: S282-286.
- Guiducci, C., M. Gong, A. M. Cepika, Z. Xu, C. Tripodo, L. Bennett, C. Crain, P. Quartier, J. J. Cush, V. Pascual, R. L. Coffman and F. J. Barrat (2013). "RNA recognition by human TLR8 can lead to autoimmune inflammation." *J Exp Med* 210(13): 2903-2919.
- Guo, B. and G. Cheng (2007). "Modulation of the interferon antiviral response by the TBK1/IKKi adaptor protein TANK." *J Biol Chem* 282(16): 11817-11826.
- Gurcel, L., L. Abrami, S. Girardin, J. Tschoop and F. G. van der Goot (2006). "Caspase-1 activation of lipid metabolic pathways in response to bacterial pore-forming toxins promotes cell survival." *Cell* 126(6): 1135-1145.
- Hacker, H., P. H. Tseng and M. Karin (2011). "Expanding TRAF function: TRAF3 as a tri-faced immune regulator." *Nature reviews. Immunology* 11(7): 457-468.
- Hagmann, C. A., A. M. Herzner, Z. Abdullah, T. Zillinger, C. Jakobs, C. Schuberth, C. Coch, P. G. Higgins, H. Wisplinghoff, W. Barchet, V. Hornung, G. Hartmann and M. Schlee (2013). "RIG-I detects triphosphorylated RNA of *Listeria monocytogenes* during infection in non-immune cells." *PLoS One* 8(4): e62872.
- Han, X., X. Li, S. C. Yue, A. Anandaiah, F. Hashem, P. S. Reinach, H. Koziel and S. D. Tachado (2012). "Epigenetic regulation of tumor necrosis factor alpha (TNFalpha) release in human macrophages by HIV-1 single-stranded RNA (ssRNA) is dependent on TLR8 signaling." *J Biol Chem* 287(17): 13778-13786.
- Hawlich, H. and J. Kohl (2006). "Complement and Toll-like receptors: key regulators of adaptive immune responses." *Molecular immunology* 43(1-2): 13-21.

- Hayashi, F., K. D. Smith, A. Ozinsky, T. R. Hawn, E. C. Yi, D. R. Goodlett, J. K. Eng, S. Akira, D. M. Underhill and A. Aderem (2001). "The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5." *Nature* 410(6832): 1099-1103.
- Heil, F., P. Ahmad-Nejad, H. Hemmi, H. Hochrein, F. Ampenberger, T. Gellert, H. Dietrich, G. Lipford, K. Takeda, S. Akira, H. Wagner and S. Bauer (2003). "The Toll-like receptor 7 (TLR7)-specific stimulus loxoribine uncovers a strong relationship within the TLR7, 8 and 9 subfamily." *European journal of immunology* 33(11): 2987-2997.
- Heil, F., H. Hemmi, H. Hochrein, F. Ampenberger, C. Kirschning, S. Akira, G. Lipford, H. Wagner and S. Bauer (2004). "Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8." *Science* 303(5663): 1526-1529.
- Heinemann, A., F. Zhao, S. Pechlivanis, J. Eberle, A. Steinle, S. Diederichs, D. Schadendorf and A. Paschen (2012). "Tumor suppressive microRNAs miR-34a/c control cancer cell expression of ULBP2, a stress-induced ligand of the natural killer cell receptor NKG2D." *Cancer research* 72(2): 460-471.
- Hemmi, H., T. Kaisho, O. Takeuchi, S. Sato, H. Sanjo, K. Hoshino, T. Horiuchi, H. Tomizawa, K. Takeda and S. Akira (2002). "Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway." *Nat Immunol* 3(2): 196-200.
- Hemmi, H., O. Takeuchi, T. Kawai, T. Kaisho, S. Sato, H. Sanjo, M. Matsumoto, K. Hoshino, H. Wagner, K. Takeda and S. Akira (2000). "A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA." *Nature* 408(6813): 740-745.
- Hidmark, A., A. von Saint Paul and A. H. Dalpke (2012). "Cutting edge: TLR13 is a receptor for bacterial RNA." *J Immunol* 189(6): 2717-2721.
- Hoebe, K., P. Georgel, S. Rutschmann, X. Du, S. Mudd, K. Crozat, S. Sovath, L. Shamel, T. Hartung, U. Zahringer and B. Beutler (2005). "CD36 is a sensor of diacylglycerides." *Nature* 433(7025): 523-527.
- Hornig, T., G. M. Barton, R. A. Flavell and R. Medzhitov (2002). "The adaptor molecule TIRAP provides signalling specificity for Toll-like receptors." *Nature* 420(6913): 329-333.
- Hornung, V., A. Ablasser, M. Charrel-Dennis, F. Bauernfeind, G. Horvath, D. R. Caffrey, E. Latz and K. A. Fitzgerald (2009). "AIM2 recognizes cytosolic dsDNA and forms a caspase-1-activating inflammasome with ASC." *Nature* 458(7237): 514-518.
- Hornung, V., J. Ellegast, S. Kim, K. Brzozka, A. Jung, H. Kato, H. Poeck, S. Akira, K. K. Conzelmann, M. Schlee, S. Endres and G. Hartmann (2006). "5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I." *Science* 314(5801): 994-997.
- Hornung, V., M. Guenthner-Biller, C. Bourquin, A. Ablasser, M. Schlee, S. Uematsu, A. Noronha, M. Manoharan, S. Akira, A. de Fougères, S. Endres and G. Hartmann (2005). "Sequence-specific potent induction of IFN- α by short interfering RNA in plasmacytoid dendritic cells through TLR7." *Nat Med* 11(3): 263-270.
- Hornung, V., S. Rothenfusser, S. Britsch, A. Krug, B. Jahrsdorfer, T. Giese, S. Endres and G. Hartmann (2002). "Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides." *J Immunol* 168(9): 4531-4537.
- Hoving, J. C., G. J. Wilson and G. D. Brown (2014). "Signalling C-type lectin receptors, microbial recognition and immunity." *Cell Microbiol* 16(2): 185-194.

- Huang, F., J. Adelman, H. Jiang, N. I. Goldstein and P. B. Fisher (1999). "Differentiation induction subtraction hybridization (DISH): a strategy for cloning genes displaying differential expression during growth arrest and terminal differentiation." *Gene* 236(1): 125-131.
- Huang, Q. Q. and R. M. Pope (2009). "The role of toll-like receptors in rheumatoid arthritis." *Curr Rheumatol Rep* 11(5): 357-364.
- Imler, J. L. and J. A. Hoffmann (2001). "Toll receptors in innate immunity." *Trends Cell Biol* 11(7): 304-311.
- Ishii, N., K. Funami, M. Tatematsu, T. Seya and M. Matsumoto (2014). "Endosomal localization of TLR8 confers distinctive proteolytic processing on human myeloid cells." *J Immunol* 193(10): 5118-5128.
- Ishikawa, E., T. Ishikawa, Y. S. Morita, K. Toyonaga, H. Yamada, O. Takeuchi, T. Kinoshita, S. Akira, Y. Yoshikai and S. Yamasaki (2009). "Direct recognition of the mycobacterial glycolipid, trehalose dimycolate, by C-type lectin Mincle." *J Exp Med* 206(13): 2879-2888.
- Itoh, H., M. Tatematsu, A. Watanabe, K. Iwano, K. Funami, T. Seya and M. Matsumoto (2011). "UNC93B1 physically associates with human TLR8 and regulates TLR8-mediated signaling." *PLoS One* 6(12): e28500.
- Janeway, C. A., Jr. (1989). "Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology." *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* 54 Pt 1: 1-13.
- Jiang, R., J. Ye, B. Zhu, Y. Song, H. Chen and S. Cao (2014). "Roles of TLR3 and RIG-I in mediating the inflammatory response in mouse microglia following Japanese encephalitis virus infection." *Journal of immunology research* 2014: 787023.
- Jin, M. S., S. E. Kim, J. Y. Heo, M. E. Lee, H. M. Kim, S. G. Paik, H. Lee and J. O. Lee (2007). "Crystal structure of the TLR1-TLR2 heterodimer induced by binding of a tri-acylated lipopeptide." *Cell* 130(6): 1071-1082.
- Jurk, M., F. Heil, J. Vollmer, C. Schetter, A. M. Krieg, H. Wagner, G. Lipford and S. Bauer (2002). "Human TLR7 or TLR8 independently confer responsiveness to the antiviral compound R-848." *Nat Immunol* 3(6): 499.
- Kagan, J. C., T. Su, T. Horng, A. Chow, S. Akira and R. Medzhitov (2008). "TRAM couples endocytosis of Toll-like receptor 4 to the induction of interferon-beta." *Nat Immunol* 9(4): 361-368.
- Kaminska, K. H., E. Purta, L. H. Hansen, J. M. Bujnicki, B. Vester and K. S. Long (2010). "Insights into the structure, function and evolution of the radical-SAM 23S rRNA methyltransferase Cfr that confers antibiotic resistance in bacteria." *Nucleic Acids Res* 38(5): 1652-1663.
- Kang, D. C., R. V. Gopalkrishnan, Q. Wu, E. Jankowsky, A. M. Pyle and P. B. Fisher (2002). "mda-5: An interferon-inducible putative RNA helicase with double-stranded RNA-dependent ATPase activity and melanoma growth-suppressive properties." *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(2): 637-642.
- Kanneganti, T. D., N. Ozoren, M. Body-Malapel, A. Amer, J. H. Park, L. Franchi, J. Whitfield, W. Barchet, M. Colonna, P. Vandenabeele, J. Bertin, A. Coyle, E. P. Grant, S. Akira and G. Nunez (2006). "Bacterial RNA and small antiviral compounds activate caspase-1 through cryopyrin/Nalp3." *Nature* 440(7081): 233-236.
- Kariko, K., M. Buckstein, H. Ni and D. Weissman (2005). "Suppression of RNA recognition by Toll-like receptors: the impact of nucleoside modification and the evolutionary origin of RNA." *Immunity* 23(2): 165-175.

- Kariko, K. and D. Weissman (2007). "Naturally occurring nucleoside modifications suppress the immunostimulatory activity of RNA: implication for therapeutic RNA development." *Curr Opin Drug Discov Devel* 10(5): 523-532.
- Kasamatsu, J. (2013). "Evolution of innate and adaptive immune systems in jawless vertebrates." *Microbiol Immunol* 57(1): 1-12.
- Kashuba, V. I., A. I. Protopopov, S. M. Kvasha, R. Z. Gizatullin, C. Wahlestedt, L. L. Kisselev, G. Klein and E. R. Zabarovsky (2002). "hUNC93B1: a novel human gene representing a new gene family and encoding an unc-93-like protein." *Gene* 283(1-2): 209-217.
- Kato, H., O. Takeuchi, S. Sato, M. Yoneyama, M. Yamamoto, K. Matsui, S. Uematsu, A. Jung, T. Kawai, K. J. Ishii, O. Yamaguchi, K. Otsu, T. Tsujimura, C. S. Koh, C. Reis e Sousa, Y. Matsuura, T. Fujita and S. Akira (2006). "Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses." *Nature* 441(7089): 101-105.
- Kawai, T. and S. Akira (2006). "TLR signaling." *Cell death and differentiation* 13(5): 816-825.
- Kawai, T. and S. Akira (2010). "The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors." *Nat Immunol* 11(5): 373-384.
- Kawai, T. and S. Akira (2011). "Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity." *Immunity* 34(5): 637-650.
- Kawai, T., K. Takahashi, S. Sato, C. Coban, H. Kumar, H. Kato, K. J. Ishii, O. Takeuchi and S. Akira (2005). "IPS-1, an adaptor triggering RIG-I- and Mda5-mediated type I interferon induction." *Nat Immunol* 6(10): 981-988.
- Kehrenberg, C., S. Schwarz, L. Jacobsen, L. H. Hansen and B. Vester (2005). "A new mechanism for chloramphenicol, florfenicol and clindamycin resistance: methylation of 23S ribosomal RNA at A2503." *Mol Microbiol* 57(4): 1064-1073.
- Kirschning, C. J., H. Wesche, T. Merrill Ayres and M. Rothe (1998). "Human toll-like receptor 2 confers responsiveness to bacterial lipopolysaccharide." *J Exp Med* 188(11): 2091-2097.
- Klevens, R. M., M. A. Morrison, J. Nadle, S. Petit, K. Gershman, S. Ray, L. H. Harrison, R. Lynfield, G. Dumyati, J. M. Townes, A. S. Craig, E. R. Zell, G. E. Fosheim, L. K. McDougal, R. B. Carey, S. K. Fridkin and M. I. Active Bacterial Core surveillance (2007). "Invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in the United States." *JAMA* 298(15): 1763-1771.
- Kobe, B. and A. V. Kajava (2001). "The leucine-rich repeat as a protein recognition motif." *Curr Opin Struct Biol* 11(6): 725-732.
- Koblansky, A. A., D. Jankovic, H. Oh, S. Hieny, W. Sungnak, R. Mathur, M. S. Hayden, S. Akira, A. Sher and S. Ghosh (2013). "Recognition of profilin by Toll-like receptor 12 is critical for host resistance to *Toxoplasma gondii*." *Immunity* 38(1): 119-130.
- Kolakofsky, D., E. Kowalinski and S. Cusack (2012). "A structure-based model of RIG-I activation." *RNA* 18(12): 2118-2127.
- Kovalic, D., R. B. Giannattasio and B. Weisblum (1995). "Methylation of minimalist 23S rRNA sequences in vitro by ErmSF (TlrA) N-methyltransferase." *Biochemistry* 34(48): 15838-15844.
- Kumar, H., T. Kawai and S. Akira (2011). "Pathogen recognition by the innate immune system." *Int Rev Immunol* 30(1): 16-34.
- Kurt-Jones, E. A., L. Popova, L. Kwinn, L. M. Haynes, L. P. Jones, R. A. Tripp, E. E. Walsh, M. W. Freeman, D. T. Golenbock, L. J. Anderson and R. W. Finberg

- (2000). "Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus." *Nat Immunol* 1(5): 398-401.
- Lai, C. J. and B. Weisblum (1971). "Altered methylation of ribosomal RNA in an erythromycin-resistant strain of *Staphylococcus aureus*." *Proc Natl Acad Sci U S A* 68(4): 856-860.
- LaMarre, J. M., J. B. Locke, K. J. Shaw and A. S. Mankin (2011). "Low fitness cost of the multidrug resistance gene *cfr*." *Antimicrob Agents Chemother* 55(8): 3714-3719.
- Lamkanfi, M. and V. M. Dixit (2012). "Inflammasomes and their roles in health and disease." *Annu Rev Cell Dev Biol* 28: 137-161.
- Latz, E., A. Visintin, E. Lien, K. A. Fitzgerald, B. G. Monks, E. A. Kurt-Jones, D. T. Golenbock and T. Espevik (2002). "Lipopolysaccharide rapidly traffics to and from the Golgi apparatus with the toll-like receptor 4-MD-2-CD14 complex in a process that is distinct from the initiation of signal transduction." *J Biol Chem* 277(49): 47834-47843.
- Lee, B. L., J. E. Moon, J. H. Shu, L. Yuan, Z. R. Newman, R. Schekman and G. M. Barton (2013). "UNC93B1 mediates differential trafficking of endosomal TLRs." *eLife* 2: e00291.
- Lee, S. M., K. H. Kok, M. Jaume, T. K. Cheung, T. F. Yip, J. C. Lai, Y. Guan, R. G. Webster, D. Y. Jin and J. S. Peiris (2014). "Toll-like receptor 10 is involved in induction of innate immune responses to influenza virus infection." *Proc Natl Acad Sci U S A* 111(10): 3793-3798.
- Lemaitre, B., E. Nicolas, L. Michaut, J. M. Reichhart and J. A. Hoffmann (1996). "The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults." *Cell* 86(6): 973-983.
- Li, X. D. and Z. J. Chen (2012). "Sequence specific detection of bacterial 23S ribosomal RNA by TLR13." *eLife* 1: e00102.
- Lincez, P. J., I. Shanina and M. S. Horwitz (2015). "Reduced expression of the MDA5 gene *IFIH1* prevents autoimmune diabetes." *Diabetes*
- Litman, G. W., J. P. Rast and S. D. Fugmann (2010). "The origins of vertebrate adaptive immunity." *Nature reviews. Immunology* 10(8): 543-553.
- Liu, J., C. Xu, L. C. Hsu, Y. Luo, R. Xiang and T. H. Chuang (2010). "A five-amino-acid motif in the undefined region of the TLR8 ectodomain is required for species-specific ligand recognition." *Molecular immunology* 47(5): 1083-1090.
- Liu, S., J. Chen, X. Cai, J. Wu, X. Chen, Y. T. Wu, L. Sun and Z. J. Chen (2013). "MAVS recruits multiple ubiquitin E3 ligases to activate antiviral signaling cascades." *eLife* 2: e00785.
- Lombardi, V., L. Van Overtvelt, S. Horiot and P. Moingeon (2009). "Human dendritic cells stimulated via TLR7 and/or TLR8 induce the sequential production of IL-10, IFN-gamma, and IL-17A by naive CD4+ T cells." *J Immunol* 182(6): 3372-3379.
- Loo, Y. M., J. Fornek, N. Crochet, G. Bajwa, O. Perwitasari, L. Martinez-Sobrido, S. Akira, M. A. Gill, A. Garcia-Sastre, M. G. Katze and M. Gale, Jr. (2008). "Distinct RIG-I and MDA5 signaling by RNA viruses in innate immunity." *J Virol* 82(1): 335-345.
- Loo, Y. M. and M. Gale, Jr. (2011). "Immune signaling by RIG-I-like receptors." *Immunity* 34(5): 680-692.
- Lowy, F. D. (1998). "*Staphylococcus aureus* infections." *The New England journal of medicine* 339(8): 520-532.

- Lu, C., H. Xu, C. T. Ranjith-Kumar, M. T. Brooks, T. Y. Hou, F. Hu, A. B. Herr, R. K. Strong, C. C. Kao and P. Li (2010). "The structural basis of 5' triphosphate double-stranded RNA recognition by RIG-I C-terminal domain." *Structure* 18(8): 1032-1043.
- Lund, J. M., L. Alexopoulou, A. Sato, M. Karow, N. C. Adams, N. W. Gale, A. Iwasaki and R. A. Flavell (2004). "Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7." *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(15): 5598-5603.
- Martin, G. S., D. M. Mannino, S. Eaton and M. Moss (2003). "The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000." *The New England journal of medicine* 348(16): 1546-1554.
- Martinez, J., X. Huang and Y. Yang (2010). "Toll-like receptor 8-mediated activation of murine plasmacytoid dendritic cells by vaccinia viral DNA." *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(14): 6442-6447.
- Martinon, F., K. Burns and J. Tschopp (2002). "The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta." *Molecular cell* 10(2): 417-426.
- Martinon, F., V. Petrilli, A. Mayor, A. Tardivel and J. Tschopp (2006). "Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome." *Nature* 440(7081): 237-241.
- Massari, P., A. Visintin, J. Gunawardana, K. A. Halmen, C. A. King, D. T. Golenbock and L. M. Wetzler (2006). "Meningococcal porin PorB binds to TLR2 and requires TLR1 for signaling." *J Immunol* 176(4): 2373-2380.
- Mata-Haro, V., C. Cekic, M. Martin, P. M. Chilton, C. R. Casella and T. C. Mitchell (2007). "The vaccine adjuvant monophosphoryl lipid A as a TRIF-biased agonist of TLR4." *Science* 316(5831): 1628-1632.
- Mathur, R., H. Oh, D. Zhang, S. G. Park, J. Seo, A. Koblansky, M. S. Hayden and S. Ghosh (2012). "A mouse model of Salmonella typhi infection." *Cell* 151(3): 590-602.
- McCartney, S. A., L. B. Thackray, L. Gitlin, S. Gilfillan, H. W. Virgin and M. Colonna (2008). "MDA-5 recognition of a murine norovirus." *PLoS Pathog* 4(7): e1000108.
- McGreal, E. P., M. Rosas, G. D. Brown, S. Zamze, S. Y. Wong, S. Gordon, L. Martinez-Pomares and P. R. Taylor (2006). "The carbohydrate-recognition domain of Dectin-2 is a C-type lectin with specificity for high mannose." *Glycobiology* 16(5): 422-430.
- Medzhitov, R. and C. A. Janeway, Jr. (1997). "Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition." *Cell* 91(3): 295-298.
- Meylan, E., J. Curran, K. Hofmann, D. Moradpour, M. Binder, R. Bartenschlager and J. Tschopp (2005). "Cardif is an adaptor protein in the RIG-I antiviral pathway and is targeted by hepatitis C virus." *Nature* 437(7062): 1167-1172.
- Mitcham, J. L., P. Parnet, T. P. Bonnert, K. E. Garka, M. J. Gerhart, J. L. Slack, M. A. Gayle, S. K. Dower and J. E. Sims (1996). "T1/ST2 signaling establishes it as a member of an expanding interleukin-1 receptor family." *J Biol Chem* 271(10): 5777-5783.
- Moghaddam, B., S. E. McNeil, Q. Zheng, A. R. Mohammed and Y. Perrie (2011). "Exploring the correlation between lipid packaging in lipoplexes and their transfection efficacy." *Pharmaceutics* 3(4): 848-864.
- Montz, H., K. C. Koch, R. Zierz and O. Gotze (1991). "The role of C5a in interleukin-6 production induced by lipopolysaccharide or interleukin-1." *Immunology* 74(3): 373-379.

- Mulla, M. J., K. Myrtolli, S. Tadesse, N. L. Stanwood, A. Gariepy, S. Guller, E. R. Norwitz and V. M. Abrahams (2012). "Cutting-Edge Report: TLR10 Plays a Role in Mediating Bacterial Peptidoglycan-Induced Trophoblast Apoptosis." *Am J Reprod Immunol*
- Müller, S. D., M. R. Müller, M. Huber, U. Esche Uv, C. J. Kirschning, H. Wagner, W. G. Bessler and K. Mittenbuhler (2004). "Triacyl-lipopentapeptide adjuvants: TLR2-dependent activation of macrophages and modulation of receptor-mediated cell activation by altering acyl-moieties." *Int Immunopharmacol* 4(10-11): 1287-1300.
- Myong, S., S. Cui, P. V. Cornish, A. Kirchhofer, M. U. Gack, J. U. Jung, K. P. Hopfner and T. Ha (2009). "Cytosolic viral sensor RIG-I is a 5'-triphosphate-dependent translocase on double-stranded RNA." *Science* 323(5917): 1070-1074.
- Nakamura, J., K. Shibata, A. Hasebe, T. Into, T. Watanabe and N. Ohata (2002). "Signaling pathways induced by lipoproteins derived from *Mycoplasma salivarium* and a synthetic lipopeptide (FSL-1) in normal human gingival fibroblasts." *Microbiol Immunol* 46(3): 151-158.
- Netea, M. G., C. Van der Graaf, J. W. Van der Meer and B. J. Kullberg (2004). "Recognition of fungal pathogens by Toll-like receptors." *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 23(9): 672-676.
- Netea, M. G. and J. W. van der Meer (2011). "Immunodeficiency and genetic defects of pattern-recognition receptors." *The New England journal of medicine* 364(1): 60-70.
- Oldenburg, M., A. Krüger, R. Ferstl, A. Kaufmann, G. Nees, A. Sigmund, B. Bathke, H. Lauterbach, M. Suter, S. Dreher, U. Koedel, S. Akira, T. Kawai, J. Buer, H. Wagner, S. Bauer, H. Hochrein and C. J. Kirschning (2012). "TLR13 recognizes bacterial 23S rRNA devoid of erythromycin resistance-forming modification." *Science* 337(6098): 1111-1115.
- Ozinsky, A., D. M. Underhill, J. D. Fontenot, A. M. Hajjar, K. D. Smith, C. B. Wilson, L. Schroeder and A. Aderem (2000). "The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(25): 13766-13771.
- Pantel, A., A. Teixeira, E. Haddad, E. G. Wood, R. M. Steinman and M. P. Longhi (2014). "Direct type I IFN but not MDA5/TLR3 activation of dendritic cells is required for maturation and metabolic shift to glycolysis after poly IC stimulation." *PLoS biology* 12(1): e1001759.
- Parroche, P., F. N. Lauw, N. Goutagny, E. Latz, B. G. Monks, A. Visintin, K. A. Halmen, M. Lamphier, M. Olivier, D. C. Bartholomeu, R. T. Gazzinelli and D. T. Golenbock (2007). "Malaria hemozoin is immunologically inert but radically enhances innate responses by presenting malaria DNA to Toll-like receptor 9." *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(6): 1919-1924.
- Peacock, S. J., I. de Silva and F. D. Lowy (2001). "What determines nasal carriage of *Staphylococcus aureus*?" *Trends Microbiol* 9(12): 605-610.
- Pei, A., C. W. Nossa, P. Chokshi, M. J. Blaser, L. Yang, D. M. Rosmarin and Z. Pei (2009). "Diversity of 23S rRNA genes within individual prokaryotic genomes." *PLoS One* 4(5): e5437.
- Petrov, A. S., C. R. Bernier, E. HersHKovits, Y. Xue, C. C. Waterbury, C. Hsiao, V. G. Stepanov, E. A. Gaucher, M. A. Grover, S. C. Harvey, N. V. Hud, R. M. Wartell, G. E. Fox and L. D. Williams (2013). "Secondary structure and domain architecture of the 23S and 5S rRNAs." *Nucleic Acids Res* 41(15): 7522-7535.

- Pfister, P., N. Corti, S. Hobbie, C. Bruell, R. Zarivach, A. Yonath and E. C. Bottger (2005). "23S rRNA base pair 2057-2611 determines ketolide susceptibility and fitness cost of the macrolide resistance mutation 2058A-->G." *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(14): 5180-5185.
- Picard, C., A. Puel, M. Bonnet, C. L. Ku, J. Bustamante, K. Yang, C. Soudais, S. Dupuis, J. Feinberg, C. Fieschi, C. Elbim, R. Hitchcock, D. Lammas, G. Davies, A. Al-Ghonaïm, H. Al-Rayes, S. Al-Jumaah, S. Al-Hajjar, I. Z. Al-Mohsen, H. H. Frayha, R. Rucker, T. R. Hawn, A. Aderem, H. Tufenkeji, S. Haraguchi, N. K. Day, R. A. Good, M. A. Gougerot-Pocidalo, A. Ozinsky and J. L. Casanova (2003). "Pyogenic bacterial infections in humans with IRAK-4 deficiency." *Science* 299(5615): 2076-2079.
- Pichlmair, A., O. Schulz, C. P. Tan, T. I. Naslund, P. Liljestrom, F. Weber and C. Reis e Sousa (2006). "RIG-I-mediated antiviral responses to single-stranded RNA bearing 5'-phosphates." *Science* 314(5801): 997-1001.
- Pifer, R., A. Benson, C. R. Sturge and F. Yarovinsky (2011). "UNC93B1 is essential for TLR11 activation and IL-12-dependent host resistance to *Toxoplasma gondii*." *J Biol Chem* 286(5): 3307-3314.
- Plattner, F., F. Yarovinsky, S. Romero, D. Didry, M. F. Carlier, A. Sher and D. Soldati-Favre (2008). "Toxoplasma profilin is essential for host cell invasion and TLR11-dependent induction of an interleukin-12 response." *Cell Host Microbe* 3(2): 77-87.
- Pluddemann, A., S. Mukhopadhyay and S. Gordon (2011). "Innate immunity to intracellular pathogens: macrophage receptors and responses to microbial entry." *Immunol Rev* 240(1): 11-24.
- Pluddemann, A., C. Neyen and S. Gordon (2007). "Macrophage scavenger receptors and host-derived ligands." *Methods* 43(3): 207-217.
- Polacek, N., M. Gaynor, A. Yassin and A. S. Mankin (2001). "Ribosomal peptidyl transferase can withstand mutations at the putative catalytic nucleotide." *Nature* 411(6836): 498-501.
- Poltorak, A., X. He, I. Smirnova, M. Y. Liu, C. Van Huffel, X. Du, D. Birdwell, E. Alejos, M. Silva, C. Galanos, M. Freudenberg, P. Ricciardi-Castagnoli, B. Layton and B. Beutler (1998). "Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene." *Science* 282(5396): 2085-2088.
- Qureshi, S. T., L. Lariviere, G. Leveque, S. Clermont, K. J. Moore, P. Gros and D. Malo (1999). "Endotoxin-tolerant mice have mutations in Toll-like receptor 4 (Tlr4)." *J Exp Med* 189(4): 615-625.
- Raetz, M., A. Kibardin, C. R. Sturge, R. Pifer, H. Li, E. Burstein, K. Ozato, S. Larin and F. Yarovinsky (2013). "Cooperation of TLR12 and TLR11 in the IRF8-dependent IL-12 response to *Toxoplasma gondii* profilin." *J Immunol* 191(9): 4818-4827.
- Rahman, A. H. and R. A. Eisenberg (2006). "The role of toll-like receptors in systemic lupus erythematosus." *Springer Semin Immunopathol* 28(2): 131-143.
- Rehwinkel, J., C. P. Tan, D. Goubau, O. Schulz, A. Pichlmair, K. Bier, N. Robb, F. Vreede, W. Barclay, E. Fodor and C. Reis e Sousa (2010). "RIG-I detects viral genomic RNA during negative-strand RNA virus infection." *Cell* 140(3): 397-408.
- Ritter, M., O. Gross, S. Kays, J. Ruland, F. Nimmerjahn, S. Saijo, J. Tschopp, L. E. Layland and C. Prazeres da Costa (2010). "Schistosoma mansoni triggers Dectin-2, which activates the Nlrp3 inflammasome and alters adaptive immune responses." *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(47): 20459-20464.

- Rock, F. L., G. Hardiman, J. C. Timans, R. A. Kastelein and J. F. Bazan (1998). "A family of human receptors structurally related to *Drosophila* Toll." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(2): 588-593.
- Rothenfusser, S., N. Goutagny, G. DiPerna, M. Gong, B. G. Monks, A. Schoenemeyer, M. Yamamoto, S. Akira and K. A. Fitzgerald (2005). "The RNA helicase Lgp2 inhibits TLR-independent sensing of viral replication by retinoic acid-inducible gene-I." *J Immunol* 175(8): 5260-5268.
- Saito, T. and M. Gale, Jr. (2008). "Differential recognition of double-stranded RNA by RIG-I-like receptors in antiviral immunity." *J Exp Med* 205(7): 1523-1527.
- Saito, T., R. Hirai, Y. M. Loo, D. Owen, C. L. Johnson, S. C. Sinha, S. Akira, T. Fujita and M. Gale, Jr. (2007). "Regulation of innate antiviral defenses through a shared repressor domain in RIG-I and LGP2." *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(2): 582-587.
- Saito, T., D. M. Owen, F. Jiang, J. Marcotrigiano and M. Gale, Jr. (2008). "Innate immunity induced by composition-dependent RIG-I recognition of hepatitis C virus RNA." *Nature* 454(7203): 523-527.
- Sato, K., X. L. Yang, T. Yodate, J. S. Chung, J. Wu, K. Luby-Phelps, R. P. Kimberly, D. Underhill, P. D. Cruz, Jr. and K. Ariizumi (2006). "Dectin-2 is a pattern recognition receptor for fungi that couples with the Fc receptor gamma chain to induce innate immune responses." *J Biol Chem* 281(50): 38854-38866.
- Satoh, T., H. Kato, Y. Kumagai, M. Yoneyama, S. Sato, K. Matsushita, T. Tsujimura, T. Fujita, S. Akira and O. Takeuchi (2010). "LGP2 is a positive regulator of RIG-I- and MDA5-mediated antiviral responses." *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(4): 1512-1517.
- Schlee, M., A. Roth, V. Hornung, C. A. Hagmann, V. Wimmenauer, W. Barchet, C. Coch, M. Janke, A. Mihailovic, G. Wardle, S. Juraneck, H. Kato, T. Kawai, H. Poeck, K. A. Fitzgerald, O. Takeuchi, S. Akira, T. Tuschl, E. Latz, J. Ludwig and G. Hartmann (2009). "Recognition of 5' triphosphate by RIG-I helicase requires short blunt double-stranded RNA as contained in panhandle of negative-strand virus." *Immunity* 31(1): 25-34.
- Schmid-Burgk, J. L., T. Schmidt, M. M. Gaidt, K. Pelka, E. Latz, T. S. Ebert and V. Hornung (2014). "OutKnocker: a web tool for rapid and simple genotyping of designer nuclease edited cell lines." *Genome Res* 24(10): 1719-1723.
- Schmidt, A., T. Schwerdt, W. Hamm, J. C. Hellmuth, S. Cui, M. Wenzel, F. S. Hoffmann, M. C. Michallet, R. Besch, K. P. Hopfner, S. Endres and S. Rothenfusser (2009). "5'-triphosphate RNA requires base-paired structures to activate antiviral signaling via RIG-I." *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(29): 12067-12072.
- Schmolke, M., J. R. Patel, E. de Castro, M. T. Sanchez-Aparicio, M. B. Uccellini, J. C. Miller, B. Manicassamy, T. Satoh, T. Kawai, S. Akira, M. Merad and A. Garcia-Sastre (2014). "RIG-I detects mRNA of intracellular *Salmonella enterica* serovar Typhimurium during bacterial infection." *mBio* 5(2): e01006-01014.
- Schwandner, R., R. Dziarski, H. Wesche, M. Rothe and C. J. Kirschning (1999). "Peptidoglycan- and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by toll-like receptor 2." *J Biol Chem* 274(25): 17406-17409.
- Sergiev, P. V., M. V. Serebryakova, A. A. Bogdanov and O. A. Dontsova (2008). "The ybiN gene of *Escherichia coli* encodes adenine-N6 methyltransferase specific for modification of A1618 of 23 S ribosomal RNA, a methylated residue located close to the ribosomal exit tunnel." *J Mol Biol* 375(1): 291-300.

- Sha, W., H. Mitoma, S. Hanabuchi, M. Bao, L. Weng, N. Sugimoto, Y. Liu, Z. Zhang, J. Zhong, B. Sun and Y. J. Liu (2014). "Human NLRP3 inflammasome senses multiple types of bacterial RNAs." *Proc Natl Acad Sci U S A* 111(45): 16059-16064.
- Shabani, M., S. Hemmati, R. Hadavi, Z. Amirghofran, M. Jeddi-Tehrani, H. Rabbani and F. Shokri (2010). "Optimization of Gene Transfection in Murine Myeloma Cell Lines using Different Transfection Reagents." *Avicenna J Med Biotechnol* 2(3): 123-130.
- Shatkin, A. J. and J. L. Manley (2000). "The ends of the affair: capping and polyadenylation." *Nat Struct Biol* 7(10): 838-842.
- Shibata, T., N. Takemura, Y. Motoi, Y. Goto, T. Karuppuhachamy, K. Izawa, X. Li, S. Akashi-Takamura, N. Tanimura, J. Kunisawa, H. Kiyono, S. Akira, T. Kitamura, J. Kitaura, S. Uematsu and K. Miyake (2012). "PRAT4A-dependent expression of cell surface TLR5 on neutrophils, classical monocytes and dendritic cells." *International immunology* 24(10): 613-623.
- Shimazu, R., S. Akashi, H. Ogata, Y. Nagai, K. Fukudome, K. Miyake and M. Kimoto (1999). "MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4." *J Exp Med* 189(11): 1777-1782.
- Shoda, L. K., K. A. Kegerreis, C. E. Suarez, I. Roditi, R. S. Corral, G. M. Bertot, J. Norimine and W. C. Brown (2001). "DNA from protozoan parasites *Babesia bovis*, *Trypanosoma cruzi*, and *T. brucei* is mitogenic for B lymphocytes and stimulates macrophage expression of interleukin-12, tumor necrosis factor alpha, and nitric oxide." *Infect Immun* 69(4): 2162-2171.
- Small, M. C., P. Lopes, R. B. Andrade and A. D. Mackerell, Jr. (2013). "Impact of ribosomal modification on the binding of the antibiotic telithromycin using a combined grand canonical monte carlo/molecular dynamics simulation approach." *PLoS Comput Biol* 9(6): e1003113.
- Spiller, S., S. Dreher, G. Meng, A. Grabiec, W. Thomas, T. Hartung, K. Pfeffer, H. Hochrein, H. Brade, W. Bessler, H. Wagner and C. J. Kirschning (2007). "Cellular recognition of trimyristoylated peptide or enterobacterial lipopolysaccharide via both TLR2 and TLR4." *J Biol Chem* 282(18): 13190-13198.
- Spiller, S., G. Elson, R. Ferstl, S. Dreher, T. Mueller, M. Freudenberg, B. Daubeuf, H. Wagner and C. J. Kirschning (2008). "TLR4-induced IFN-gamma production increases TLR2 sensitivity and drives Gram-negative sepsis in mice." *J Exp Med* 205(8): 1747-1754.
- Stokholm, J., S. Schjorring, C. E. Eskildsen, L. Pedersen, A. L. Bischoff, N. Folsgaard, C. G. Carson, B. L. Chawes, K. Bonnelykke, A. Molgaard, B. Jacobsson, K. A. Krogfelt and H. Bisgaard (2014). "Antibiotic use during pregnancy alters the commensal vaginal microbiota." *Clin Microbiol Infect* 20(7): 629-635.
- Su, A. I., T. Wiltshire, S. Batalov, H. Lapp, K. A. Ching, D. Block, J. Zhang, R. Soden, M. Hayakawa, G. Kreiman, M. P. Cooke, J. R. Walker and J. B. Hogenesch (2004). "A gene atlas of the mouse and human protein-encoding transcriptomes." *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(16): 6062-6067.
- Sun, Y. W. (1997). "RIG-I, a human homologue gene of RNA helicase, is induced by retinoic acid during the differentiation of acute promyelocytic leukemia cell." *PhD Thesis, Shanghai Second Medical University*
- Tabeta, K., K. Hoebe, E. M. Janssen, X. Du, P. Georgel, K. Crozat, S. Mudd, N. Mann, S. Sovath, J. Goode, L. Shamel, A. A. Herskovits, D. A. Portnoy, M.

- Cooke, L. M. Tarantino, T. Wiltshire, B. E. Steinberg, S. Grinstein and B. Beutler (2006). "The Unc93b1 mutation 3d disrupts exogenous antigen presentation and signaling via Toll-like receptors 3, 7 and 9." *Nat Immunol* 7(2): 156-164.
- Takahasi, K., M. Yoneyama, T. Nishihori, R. Hirai, H. Kumeta, R. Narita, M. Gale, Jr., F. Inagaki and T. Fujita (2008). "Nonself RNA-sensing mechanism of RIG-I helicase and activation of antiviral immune responses." *Molecular cell* 29(4): 428-440.
- Takeda, K. and S. Akira (2004). "TLR signaling pathways." *Semin Immunol* 16(1): 3-9.
- Takeuchi, O. and S. Akira (2008). "MDA5/RIG-I and virus recognition." *Curr Opin Immunol* 20(1): 17-22.
- Takeuchi, O. and S. Akira (2010). "Pattern recognition receptors and inflammation." *Cell* 140(6): 805-820.
- Takeuchi, O., K. Hoshino and S. Akira (2000). "Cutting edge: TLR2-deficient and MyD88-deficient mice are highly susceptible to Staphylococcus aureus infection." *J Immunol* 165(10): 5392-5396.
- Takeuchi, O., K. Hoshino, T. Kawai, H. Sanjo, H. Takada, T. Ogawa, K. Takeda and S. Akira (1999). "Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components." *Immunity* 11(4): 443-451.
- Takeuchi, O., T. Kawai, P. F. Muhlradt, M. Morr, J. D. Radolf, A. Zychlinsky, K. Takeda and S. Akira (2001). "Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6." *International immunology* 13(7): 933-940.
- Tanimura, N., S. Saitoh, F. Matsumoto, S. Akashi-Takamura and K. Miyake (2008). "Roles for LPS-dependent interaction and relocation of TLR4 and TRAM in TRIF-signaling." *Biochemical and biophysical research communications* 368(1): 94-99.
- Tanji, H., U. Ohto, T. Shibata, K. Miyake and T. Shimizu (2013). "Structural reorganization of the Toll-like receptor 8 dimer induced by agonistic ligands." *Science* 339(6126): 1426-1429.
- Tanji, H., U. Ohto, T. Shibata, M. Taoka, Y. Yamauchi, T. Isobe, K. Miyake and T. Shimizu (2015). "Toll-like receptor 8 senses degradation products of single-stranded RNA." *Nat Struct Mol Biol* 22(2): 109-115.
- Taylor, P. R., S. V. Tsoni, J. A. Willment, K. M. Dennehy, M. Rosas, H. Findon, K. Haynes, C. Steele, M. Botto, S. Gordon and G. D. Brown (2007). "Dectin-1 is required for beta-glucan recognition and control of fungal infection." *Nat Immunol* 8(1): 31-38.
- Tenson, T. and M. Ehrenberg (2002). "Regulatory nascent peptides in the ribosomal tunnel." *Cell* 108(5): 591-594.
- Thakker-Varia, S., A. C. Ranzini and D. T. Dubin (1985). "Ribosomal RNA methylation in Staphylococcus aureus and Escherichia coli: effect of the "MLS" (erythromycin resistance) methylase." *Plasmid* 14(2): 152-161.
- Theriot, J. A., J. Rosenblatt, D. A. Portnoy, P. J. Goldschmidt-Clermont and T. J. Mitchison (1994). "Involvement of profilin in the actin-based motility of L. monocytogenes in cells and in cell-free extracts." *Cell* 76(3): 505-517.
- Ting, J. P., R. C. Lovering, E. S. Alnemri, J. Bertin, J. M. Boss, B. K. Davis, R. A. Flavell, S. E. Girardin, A. Godzik, J. A. Harton, H. M. Hoffman, J. P. Hugot, N. Inohara, A. Mackenzie, L. J. Maltais, G. Nunez, Y. Ogura, L. A. Otten, D.

- Philpott, J. C. Reed, W. Reith, S. Schreiber, V. Steimle and P. A. Ward (2008). "The NLR gene family: a standard nomenclature." *Immunity* 28(3): 285-287.
- Toh, S. M., L. Xiong, T. Bae and A. S. Mankin (2008). "The methyltransferase YfgB/RlmN is responsible for modification of adenosine 2503 in 23S rRNA." *RNA* 14(1): 98-106.
- Torio, C. M. and R. M. Andrews (2006). National Inpatient Hospital Costs: The Most Expensive Conditions by Payer, 2011: Statistical Brief #160. Healthcare Cost and Utilization Project (HCUP) Statistical Briefs. Rockville (MD).
- Tran, N. L., C. Manzin-Lorenzi and M. L. Santiago-Raber (2015). "Toll-like receptor 8 deletion accelerates autoimmunity in a mouse model of lupus through a Toll-like receptor 7-dependent mechanism." *Immunology* 145(1): 60-70.
- Uematsu, S., M. H. Jang, N. Chevrier, Z. Guo, Y. Kumagai, M. Yamamoto, H. Kato, N. Sougawa, H. Matsui, H. Kuwata, H. Hemmi, C. Coban, T. Kawai, K. J. Ishii, O. Takeuchi, M. Miyasaka, K. Takeda and S. Akira (2006). "Detection of pathogenic intestinal bacteria by Toll-like receptor 5 on intestinal CD11c+ lamina propria cells." *Nat Immunol* 7(8): 868-874.
- Underhill, D. M. and A. Ozinsky (2002). "Phagocytosis of microbes: complexity in action." *Annu Rev Immunol* 20: 825-852.
- van der Laan, L. J., E. A. Dopp, R. Haworth, T. Pikkarainen, M. Kangas, O. Elomaa, C. D. Dijkstra, S. Gordon, K. Tryggvason and G. Kraal (1999). "Regulation and functional involvement of macrophage scavenger receptor MARCO in clearance of bacteria in vivo." *J Immunol* 162(2): 939-947.
- Van Opdenbosch, N., P. Gurung, L. Vande Walle, A. Fossoul, T. D. Kanneganti and M. Lamkanfi (2014). "Activation of the NLRP1b inflammasome independently of ASC-mediated caspase-1 autoproteolysis and speck formation." *Nat Commun* 5: 3209.
- Vasilyev, N. and A. Serganov (2015). "Structures of RNA complexes with the Escherichia coli RNA pyrophosphohydrolase RppH unveil the basis for specific 5'-end-dependent mRNA decay." *J Biol Chem* 290(15): 9487-9499.
- Vela, A., O. Fedorova, S. C. Ding and A. M. Pyle (2012). "The thermodynamic basis for viral RNA detection by the RIG-I innate immune sensor." *J Biol Chem* 287(51): 42564-42573.
- Verma, R., J. H. Jung and J. Y. Kim (2014). "1,25-Dihydroxyvitamin D3 up-regulates TLR10 while down-regulating TLR2, 4, and 5 in human monocyte THP-1." *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 141: 1-6.
- Vester, B. and S. Douthwaite (1994). "Domain V of 23S rRNA contains all the structural elements necessary for recognition by the ErmE methyltransferase." *Journal of bacteriology* 176(22): 6999-7004.
- Vollmer, J. and A. M. Krieg (2009). "Immunotherapeutic applications of CpG oligodeoxynucleotide TLR9 agonists." *Advanced drug delivery reviews* 61(3): 195-204.
- Wang, Y., L. Liu, D. R. Davies and D. M. Segal (2010). "Dimerization of Toll-like receptor 3 (TLR3) is required for ligand binding." *J Biol Chem* 285(47): 36836-36841.
- Wei, T., J. Gong, F. Jamitzky, W. M. Heckl, R. W. Stark and S. C. Rossle (2009). "Homology modeling of human Toll-like receptors TLR7, 8, and 9 ligand-binding domains." *Protein science : a publication of the Protein Society* 18(8): 1684-1691.
- Weis, W. I. and K. Drickamer (1996). "Structural basis of lectin-carbohydrate recognition." *Annu Rev Biochem* 65: 441-473.

- Weisblum, B. (1995). "Erythromycin resistance by ribosome modification." *Antimicrob Agents Chemother* 39(3): 577-585.
- Werts, C., R. I. Tapping, J. C. Mathison, T. H. Chuang, V. Kravchenko, I. Saint Girons, D. A. Haake, P. J. Godowski, F. Hayashi, A. Ozinsky, D. M. Underhill, C. J. Kirschning, H. Wagner, A. Aderem, P. S. Tobias and R. J. Ulevitch (2001). "Leptospiral lipopolysaccharide activates cells through a TLR2-dependent mechanism." *Nat Immunol* 2(4): 346-352.
- Wiese, M., K. Castiglione, M. Hensel, U. Schleicher, C. Bogdan and J. Jantsch (2010). "Small interfering RNA (siRNA) delivery into murine bone marrow-derived macrophages by electroporation." *J Immunol Methods* 353(1-2): 102-110.
- Wilkins, C. and M. Gale, Jr. (2010). "Recognition of viruses by cytoplasmic sensors." *Curr Opin Immunol* 22(1): 41-47.
- Wong, S. W., M. J. Kwon, A. M. Choi, H. P. Kim, K. Nakahira and D. H. Hwang (2009). "Fatty acids modulate Toll-like receptor 4 activation through regulation of receptor dimerization and recruitment into lipid rafts in a reactive oxygen species-dependent manner." *J Biol Chem* 284(40): 27384-27392.
- Wright, J. R. (2005). "Immunoregulatory functions of surfactant proteins." *Nature reviews. Immunology* 5(1): 58-68.
- Xiao, S., F. Scott, C. A. Fierke and D. R. Engelke (2002). "Eukaryotic ribonuclease P: a plurality of ribonucleoprotein enzymes." *Annu Rev Biochem* 71: 165-189.
- Xu, Y., X. Tao, B. Shen, T. Horng, R. Medzhitov, J. L. Manley and L. Tong (2000). "Structural basis for signal transduction by the Toll/interleukin-1 receptor domains." *Nature* 408(6808): 111-115.
- Yamasaki, S., M. Matsumoto, O. Takeuchi, T. Matsuzawa, E. Ishikawa, M. Sakuma, H. Tateno, J. Uno, J. Hirabayashi, Y. Mikami, K. Takeda, S. Akira and T. Saito (2009). "C-type lectin Mincle is an activating receptor for pathogenic fungus, *Malassezia*." *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(6): 1897-1902.
- Yang, R. B., M. R. Mark, A. Gray, A. Huang, M. H. Xie, M. Zhang, A. Goddard, W. I. Wood, A. L. Gurney and P. J. Godowski (1998). "Toll-like receptor-2 mediates lipopolysaccharide-induced cellular signalling." *Nature* 395(6699): 284-288.
- Yarovinsky, F., D. Zhang, J. F. Andersen, G. L. Bannenberg, C. N. Serhan, M. S. Hayden, S. Hieny, F. S. Sutterwala, R. A. Flavell, S. Ghosh and A. Sher (2005). "TLR11 activation of dendritic cells by a protozoan profilin-like protein." *Science* 308(5728): 1626-1629.
- Yimin, M. Kohanawa, S. Zhao, M. Ozaki, S. Haga, G. Nan, Y. Kuge and N. Tamaki (2013). "Contribution of toll-like receptor 2 to the innate response against *Staphylococcus aureus* infection in mice." *PLoS One* 8(9): e74287.
- Yoneyama, M. and T. Fujita (2007). "Function of RIG-I-like receptors in antiviral innate immunity." *J Biol Chem* 282(21): 15315-15318.
- Yoneyama, M. and T. Fujita (2009). "RNA recognition and signal transduction by RIG-I-like receptors." *Immunol Rev* 227(1): 54-65.
- Yoneyama, M., M. Kikuchi, K. Matsumoto, T. Imaizumi, M. Miyagishi, K. Taira, E. Foy, Y. M. Loo, M. Gale, Jr., S. Akira, S. Yonehara, A. Kato and T. Fujita (2005). "Shared and unique functions of the DExD/H-box helicases RIG-I, MDA5, and LGP2 in antiviral innate immunity." *J Immunol* 175(5): 2851-2858.
- Yoneyama, M., M. Kikuchi, T. Natsukawa, N. Shinobu, T. Imaizumi, M. Miyagishi, K. Taira, S. Akira and T. Fujita (2004). "The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses." *Nat Immunol* 5(7): 730-737.

- Yu, P., W. Lubben, H. Slomka, J. Gebler, M. Konert, C. Cai, L. Neubrandt, O. Prazeres da Costa, S. Paul, S. Dehnert, K. Dohne, M. Thanisch, S. Storsberg, L. Wiegand, A. Kaufmann, M. Nain, L. Quintanilla-Martinez, S. Bettio, B. Schnierle, L. Kolesnikova, S. Becker, M. Schnare and S. Bauer **(2012)**. "Nucleic acid-sensing Toll-like receptors are essential for the control of endogenous retrovirus viremia and ERV-induced tumors." *Immunity* 37(5): 867-879.
- Zelensky, A. N. and J. E. Gready **(2005)**. "The C-type lectin-like domain superfamily." *FEBS J* 272(24): 6179-6217.
- Zhang, D., G. Zhang, M. S. Hayden, M. B. Greenblatt, C. Bussey, R. A. Flavell and S. Ghosh **(2004)**. "A toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria." *Science* 303(5663): 1522-1526.
- Zhang, Q., M. Raoof, Y. Chen, Y. Sumi, T. Sursal, W. Junger, K. Brohi, K. Itagaki and C. J. Hauser **(2010)**. "Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury." *Nature* 464(7285): 104-107.
- Zhou, L., X. Wang, Y. J. Wang, Y. Zhou, S. Hu, L. Ye, W. Hou, H. Li and W. Z. Ho **(2009)**. "Activation of toll-like receptor-3 induces interferon-lambda expression in human neuronal cells." *Neuroscience* 159(2): 629-637.
- Zipris, D. **(2010)**. "Toll-like receptors and type 1 diabetes." *Advances in experimental medicine and biology* 654: 585-610.
- Zou, J., M. Chang, P. Nie and C. J. Secombes **(2009)**. "Origin and evolution of the RIG-I like RNA helicase gene family." *BMC evolutionary biology* 9: 85.

8 Abkürzungsverzeichnis

-/-	defizient, <i>knock-out</i>
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
BSA	<i>bovine serum albumin</i> , Rinderserumalbumin
C	Cytosin
CaCl ₂	Calciumchlorid
CARD	<i>Caspase activation and recruitment domain</i> , Caspase-Aktivierungs- und Rekrutierungsdomäne
cDNA	<i>complementary DNA</i> , komplementäre DNA
cfu	<i>Colony forming units</i> , Kolonie formende Einheiten
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CpG	Cytosin-phosphatidyl-Guanin
DAMP	<i>danger associated molecular pattern</i> , Gefahr-assoziertes molekulares Muster
DC	<i>dendritic cell</i> , dendritische Zelle
DD	<i>death domain</i>
ddi	<i>days differentiated</i> , Tage ausdifferenziert
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethyl-Sulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate

ds	doppelsträngig
DTBP	Di-tert-butylperoxid
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i> , verstärkte Chemilumineszenz
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
Fc	<i>fragment crystallisable</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i> , Fötales Kälberserum
g	Beschleunigung
h	human
hmw	<i>hight molecular weight</i> , hochmoleklar
Leu	Leucin
LGP2	<i>laboratory of physiology 2</i>
lmw	<i>low molecular weight</i> , niedermolekular
Loxo	Loxoribine
LPS	Lipopolysaccharid
LRR	<i>leucine rich repeat</i>
LTA	<i>lipoteichoic acid</i> , Lipoteichonsäure
m	<i>mouse</i> , Maus
M	Molar
MAL	MyD88- <i>adaptor-like</i> , MyD88-Adapter-ähnlich
MAVS	<i>mitochondrial antiviral signaling protein</i>
M-CSF	<i>Macrophage colony-stimulating factor</i> , Monozytenkolonien-stimulierender Faktor
MD2	<i>myeloid differentiation factor 2</i>

MDA5	<i>melanoma diifferentiation-associated protein 5</i>
MEF	<i>Mouse embryonic fibroblasts</i> , embryonalen Maus-Fibroblasten
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MHC	<i>major histocompability complex</i> , Haupthistokompatilitätskomplex
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mRNA	<i>messenger RNA</i> , Boten RNA
MyD88	<i>myeloid differentiation marker 88</i>
n.p.	<i>not performed</i> , nicht durchgeführt
NACHT	NOD or NBD- nucleotide-binding domain
NaCl ₂	Natriumchlorid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
NF κ B	nukleärer Faktor kappa B
NGS	<i>normal goat serum</i> , Ziegenserum
NLRP	NOD-, LRR- and pyrin domain-containing
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
NOD	<i>nucleotide-binding oligomerization domain</i>
OD	optische Dichte
ODN	Oligoribonukleotid
PAGE	Polyacrylamid Gel Elektrophorese

Pam ₂ CSK ₄	Di-palmitoyl-cysteinyl-seryl-tetralysin
Pam ₃ CSK ₄	Tri-palmitoyl-cysteinyl-seryl-tetralysine
PAMP	<i>Pathogen-associated molecular pattern</i> , Pathogen-assoziiertes molekulares Muster
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PBT	PBS Tween
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerase Kettenreaktion
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Poly(I:C)	<i>Polyinosinic:polycytidylic acid</i> , Polyinosin/Polycytosin
PRR	<i>pattern recognition receptor</i> , Mustererkennungsrezeptor
PYD	Pyrin Domäne
RIG-I	<i>retinoic acid-inducible gene 1</i>
RIP	<i>receptor interacting protein</i> , Rezeptor-interagierendes Protein
RLHs	<i>RIG-like helicases</i> , RIG ähnlichen Helikasen
RLU	<i>relative light unit</i> , relative Lichteinheit
RNA	<i>ribonucleic acid</i> , Ribonucleinsäure
ROS	<i>reactive oxygen species</i> , reaktive Sauerstoff Spezies
rpm	<i>revolutions per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	<i>real time PCR</i> , Echtzeit PCR
s	Sekunden
<i>S. a.</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i> , Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunden

ss	<i>single stranded</i> , einzelsträngig
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
STING	<i>stimulator of interferon genes</i>
T	Thymin
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TCA	Trichloressigsäure
TE	Tris EDTA
TEMED	Tetramethylethylenediamin
TICAM	<i>TIR domain-containing adaptor molecule</i>
TIR	Toll/Interleukin-1 Rezeptor
TIRAP	<i>TIR domain-containing adaptor protein</i>
TLR	<i>Toll-like receptor</i> , Toll ähnlicher Rezeptor
TNF	<i>tumor necrosis factor</i> , Tumornekrosefaktor
TRAF	<i>TNF-receptor-associated factor</i> , TNF-Rezeptor-assoziiierter Faktor
TRAM	<i>TRIF-related adaptor molecule</i>
TRIF	<i>TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β</i>
Tris	Tris-(Hydroxymethyl-)Aminomethan
U	Uridin
undiff.	unausdifferenziert
unstim.	unstimuliert
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	<i>volume per volume</i>
w/v	<i>weight per volume</i>
wt	Wildtyp

z. B. zum Beispiel

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: TLR Liganden. Pathogene mit den TLR spezifischen Liganden.....	19
Tabelle 2: Murine Elisa Kits	41
Tabelle 3: Humane Elisa Kits.....	41
Tabelle 4: Primäre und Sekundäre Antikörper	41
Tabelle 5: Primer zur Genotypisierung	42
Tabelle 6: Primer für die <i>Real-Time</i> PCR.....	43
Tabelle 7: Primer für die Mutagenese.....	43
Tabelle 8: Inhibitoren	44
Tabelle 9: siRNA	44
Tabelle 10: Leervektoren	44
Tabelle 11: Vektorkonstrukte	45
Tabelle 12: Kompetente Bakterien.....	50
Tabelle 13: Bakterienstämme	50
Tabelle 14: Liganden und eingesetzte Konzentrationen	51
Tabelle 15: Synthetische ORNS mit modifizierter 23S rRNA Sequenz	90
Tabelle 16: Auf ihre Responsivität gegenüber Sa19 und BtmtD3_4 getestete humane primäre und Zelllinien.	94

10 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Sepsis und SIRS induzierende Ereignisse.	9
Abbildung 2: Mustererkennungsrezeptoren	14
Abbildung 3: IL-1 Rezeptoren und TLR rekrutieren die gleichen Adaptermoleküle.	17
Abbildung 4: Domänenstruktur der RIG-like Helikasen.	25
Abbildung 5: Erkennung Gram-positiver Bakterien durch endosomale TLRs.	72
Abbildung 6: Bakterielle RNA als Ligand endosomaler TLRs.	72
Abbildung 7: TLR11 und 12 werden nicht durch Gram-positive Bakterien aktiviert.	73
Abbildung 8: Profilin aktiviert TLR11 und TLR12.	74
Abbildung 9: Gram-positive aber nicht Gram-negative Bakterien aktivieren TLR13.	75
Abbildung 10: Aktivierung von TLR13 durch Gram-positiv bakterielle RNA.	76
Abbildung 11: Auftrennung der Total-RNA von <i>S. aureus</i> in seine Fraktionen.	77
Abbildung 12: Die Total-RNA sowie die hmw-Fraktion von <i>S. aureus</i> induziert mIL-6.	77
Abbildung 13: Die 23S aber nicht die 16S rRNA aktivierte <i>Tlr23479</i> ^{-/-} Makrophagen.	78
Abbildung 14: Schema der 23S rRNA und der sechs Domänen.	79
Abbildung 15: SalII stimuliert wt und <i>Tlr23479</i> ^{-/-} Makrophagen.	80
Abbildung 16: Die Erytromycin-Resistenz assoziierten Methyltransferasen katalysierten die Methylierung eines spezifischen Adenosins.	81
Abbildung 17: Kultivierung von MRSA in Erythromycin hebt stimulativen Effekt auf.	82
Abbildung 18: Proteinsequenz der Methyltransferase ermC.	83
Abbildung 19: Die Überexpression von Methyltransferasen in <i>E. coli</i> hebt den stimulativen Effekt der 23S rRNA auf.	83
Abbildung 20: SalII und Sa19 werden spezifisch über TLR13 erkannt.	85
Abbildung 21: Parentale und mutierte TLR13 Sequenz werden durch Restriktionsenzyme unterschiedlich geschnitten.	86
Abbildung 22: Punktmutation hebt stimulativen Effekt von SA19 auf.	86
Abbildung 23: TLR13 spezifische siRNA Varianten hemmen TLR13 Expression.	87
Abbildung 24: TLR13 spezifische siRNA inhibiert TLR13 mRNA Expression.	88
Abbildung 25: TLR13 <i>knock-down</i> in <i>Tlr23479</i> ^{-/-} Makrophagen inhibiert die stimulative Wirkung von SalII.	88
Abbildung 26: Das methylierte ORN Sa19 ist nicht stimulativ.	91
Abbildung 27: Eine spezifische Methylierung der Sa12 Sequenz verhindert die Induktion proinflammatorischer Zytokine.	92
Abbildung 28: 12mer ORN als minimale stimulierende Sequenz.	93
Abbildung 29: hPBMC erkennen die methylierte und unmethylierte Sa19 Sequenz.	94
Abbildung 30: Identische Sequenz von mitochondrieller 16S und bakterieller 23S ribosomaler RNA.	96
Abbildung 31: Mitochondrielle 16S rRNA Sequenz stimuliert hPBMC.	97

Abbildung 32: 3 Tage, aber nicht undifferenzierte und 8 Tage differenzierte THP-1 Zellen reagieren auf die ORN.	98
Abbildung 33: Die mRNA von TLR8 wird 2fach im Vergleich von undiff. 3 und 8 Tagen ausdifferenzierten THP-1 Zellen aufreguliert	99
Abbildung 34: Vergleichende Evaluierung von vier ausgewählten Transfektionsreagenzien.	100
Abbildung 35: Erkennung der ORN Sa19 und BtmtD3_4 ist durch Inhibition endosomalen TLR blockiert.	101
Abbildung 36: Chloroquin hemmt auf Stimulation mit RNA40 hin effektiver als Cytochalasin D.	102
Abbildung 37: Die Inhibition endosomaler Rezeptoren blockiert die Aktivierung von hPBMCs auf Konfrontation mit dem ORN.	102
Abbildung 38: 3ddi <i>Unc93b1</i> ^{-/-} THP-1 Zellen induzieren keine proinflammatorischen Zytokine nach Konfrontation mit den ORN Sa19 oder BtmtD3_4.	103
Abbildung 39: 3ddi parentale, aber nicht <i>Unc93b1</i> ^{-/-} THP-1 Zellen erkennen Gram-positiv und -negativ bakterielle RNA.	104
Abbildung 40: Die Responsivität von PBMCs konfrontiert mit Gram-negativ bakterielle RNA ist nicht LPS abhängig.	105
Abbildung 41: BtmtD3_4 wird lediglich über den humanen TLR8 erkannt	106
Abbildung 42: siRNA <i>knock-down</i> von hTLR8 verifiziert via RT-PCR.	107
Abbildung 43: Der <i>knock-down</i> von TLR8 per siRNA in 3ddi THP-1 Zellen inhibiert die Responsivität auf mtrRNA Applikation.	107
Abbildung 44: 3ddi <i>Tlr8</i> ^{-/-} THP-1 Zellen induzieren kein TNF nach Applikation der ORN.	108
Abbildung 45: TLR8 abhängige Erkennung großer bakterieller ribosomaler RNAs.	109
Abbildung 46: T8i hemmt dosisabhängig die Responsivität von PBMC auf die mtrRNA.	109
Abbildung 47: Uridin-abhängige Aktivierung von TLR8.	110
Abbildung 48: RNase A abhängige hiEc Erkennung.	111
Abbildung 49: T2.5 Effekt im Vergleich nach 8 und 24 h Inkubation.	112
Abbildung 50: In 3ddi <i>Tlr8</i> ^{-/-} und <i>Unc93B1</i> ^{-/-} THP-1 Zellen führt die TLR2 Blockade zur kompletten Hemmung der Immunantwort.	113
Abbildung 51: Inhibition durch Chloroquin in PBMC hemmt Zytokinproduktion effektiver als durch T2.5 nach Konfrontation mit lebenden Bakterien.	114
Abbildung 52: Gram-negative Bakterien aktivieren RIG-I aber nicht MDA-5.	115
Abbildung 53: RIG-I als Sensor für Gram-negativ bakterielle Total-RNA	116
Abbildung 54: Total RNA sowie die niedermolekulare Fraktion der Gram-negativen Bakterien aktiviert RIG-I.	117
Abbildung 55: Die tRNA von Gram-negativen Bakterien ist die stimulierende RNA Fraktion	118
Abbildung 56: Gram-positiv bakterielle RNA wird nicht über RIG-I erkannt.	119
Abbildung 57: Die Erkennung bakterieller Gram-negativer tRNA ist unabhängig von endosomalen TLRs	120
Abbildung 58: RppH und Ciap hydrolysieren 5'-Pyrophosphate der RNA.	120

Abbildung 59: Die Dephosphorylierung von pppRNA hebt ihren RIG-I stimulativen Effekt auf.	121
Abbildung 60: Triphosphorylierte tRNA stimuliert RIG-I.	122
Abbildung 61: Gram-negative RNA induziert über RIG-I Typ-I Interferon.	123
Abbildung 62: RIG-I induziert Phosphorylierung von IRF3 nach Inkubation mit Total und tRNA.	124
Abbildung 63: Methylierung oder Mutation des A2058 der 23S rRNA vermittelt Resistenz gegenüber MLS Antibiotika.	128
Abbildung 64: Signaltransduktion der endosomalen Rezeptoren TLR11, -12 und -13.	130
Abbildung 65: Strukturmodell der Ektodomäne von hTLR8	135
Abbildung 66: Schema der TLR vermittelten Zytokininduktion.	137

11 Danksagung

Die Danksagung ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

12 Lebenslauf

Die Danksagung ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten

13 Erklärung

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, g der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie zur Erlangung der Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „Titel der Dissertation“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von (Name des Doktoranden) befürworte.

Essen, den _____
Carsten Kirschning

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. 2, d und f der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe und alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen als solche gekennzeichnet habe.

Essen, den _____
Marina Oldenburg

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. 2, e und g der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe, dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist, und dass ich die Dissertation nur in diesem Verfahren einreiche.

Essen, den _____
Marina Oldenburg